

UNIVERSITA' DI PISA

**FACOLTA' DI SCIENZE
MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI**

LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

TESI DI LAUREA

**Alterazioni della neuro
trasmissione dopaminergica in
topi transgenici Engrailed doppi
eterozigoti.**

RELATORI

Prof. Giovanni Umberto Corsini
Dott.ssa Paola Sgadò

CANDIDATO

Chiara Fantacci

**ANNO ACCADEMICO
2005/2006**

*...ai miei genitori,
che mi hanno sempre sostenuto con tutta la
pazienza e l'amore del mondo...*

*...a Rita,
sorellina "quasi" perfetta....*

*...a Paola,
che mi ha insegnato ad amare la ricerca....*

*...a Silvia, a Mario, a Francesca e a tutti i
"compagni di laboratorio",
che mi hanno reso le giornate migliori...*

...a Elisa e alla sua amicizia...

*...alle mie coinquiline, Elisa e Elisabetta,
con cui ho condiviso molto di più che lo
"stesso tetto"...*

*...a Carlotta e Cristiano,
che mi hanno dato così tanto in così poco
tempo...*

*...a Nicola,
a Rossella, ad Arianna, ad Annalisa...*

...a tutti quelli che hanno creduto in me...

...a tutti quelli che mi sono stati vicini...

*...a tutti quelli che hanno contribuito a non
farmi mai sentire sola...*

GRAZIE!!!!

RIASSUNTO

I geni Engrailed, En1 ed En2, sono fattori di trascrizione a omeodominio necessari allo sviluppo ed al mantenimento dei neuroni dopaminergici (DA) mesencefalici. I neuroni dopaminergici mesencefalici rappresentano la più importante fonte di dopamina del cervello e controllano funzioni fondamentali quali la gratificazione e l'attività motoria. La neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali rappresenta la caratteristica neuropatologica della Malattia di Parkinson (MP).

Studi precedenti hanno suggerito che la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici mesencefalici sia regolata dai geni Engrailed in modo gene-dose dipendente. In questo studio abbiamo analizzato un genotipo mutante Engrailed che non era stato analizzato in precedenza, allo scopo di evidenziare deficienze del sistema dopaminergico.

In particolare, è stata osservata una diminuzione del 50% nel contenuto di dopamina nel nucleo striato di topi En1^{+/-}/En2^{+/-} rispetto ai controlli En2^{+/-} con un aumento progressivo della deplezione dopaminergica a 6 e 12 mesi di età. La conta dei neuroni dopaminergici non ha indicato alcuna differenza nel numero di cellule nel tempo nei topi En1^{+/-}/En2^{+/-} rispetto ai controlli En2^{+/-}, o nella distribuzione dei neuroni DA all'interno del mesencefalo. Questi risultati suggeriscono che le alterazioni a livello di neurotrasmissione dopaminergica osservate non sono imputabili ad una perdita di cellule dopaminergiche ma

probabilmente a modificazioni delle proiezioni dopaminergiche al nucleo striato. Per confermare questa ipotesi è stata effettuata un'analisi della distribuzione delle fibre dopaminergiche a livello dello striato attraverso un'analisi immunoistochimica con anticorpo anti trasportatore della dopamina (DAT). I risultati hanno messo in evidenza una diminuzione dell'espressione della proteina DAT nei topi $En1^{+/-}/En2^{+/-}$ rispetto ai controlli $En2^{+/-}$ che mostrano una immunoreattività normale per il DAT.

In conclusione, l'analisi presentata in questo studio ha messo in evidenza come l'inattivazione parziale dei geni *Engrailed* nei topi $En1^{+/-}En2^{+/-}$ produce alterazioni a carico del sistema dopaminergico. In particolare è stata osservata una diminuzione del contenuto di dopamina e deficit delle terminazioni dopaminergiche a livello striatale, mentre non vi sono alterazioni nella distribuzione e nel numero delle cellule dopaminergiche a livello del mesencefalo. Quest'analisi ha messo in evidenza un nuovo modello di deplezione dopaminergica su cui sarà possibile studiare l'instaurarsi di meccanismi di compenso a livello dei circuiti cerebrali su quali la dopamina ha un effetto neuromodulatorio.

ABSTRACT

In rodents, the homeodomain transcription factors Engrailed-1 e Engrailed-2 (En1 e En2) are expressed in all mesencephalic dopaminergic neurons since the onset of postmitotic differentiation up to adulthood. In Engrailed mutant mice a gene-dose dependent effect on the survival on the mesencephalic dopaminergic neurons have been observed, indicating that these genes play a crucial role in the maintenance of the embryonic e mature dopaminergic cell population (Simon et al., 2001; Alberi et al., 2004). The loss of nigral dopaminergic neurons represents the hallmark of one of the most prominent neurologic disorder, Parkinson's disease. This study aims at investigating the Engrailed gene-dose dependent effect on the maintenance of dopaminergic neurons in new Engrailed mutant mice. Engrailed double heterozygous mice (En1^{+/-}/En2^{+/-}) were investigated for alteration in the dopaminergic system.

A 50% reduction in dopamine content in the dorsal striatum was found in En1^{+/-}/En2^{+/-} mice compared to their control En2^{+/-} counterpart. The loss of striatal DA content progress over time at 6 e 12 months of age, while no alteration in the distribution and number of mesencephalic dopaminergic neurons was observed at the same ages. Our analysis suggests that the loss of DA neurotransmission does not result from a neurodegenerative process affecting the dopaminergic neurons but may be caused by alterations in striatal synaptic transmission. To confirm this

hypothesis we performed a detailed analysis of DA fibres distribution in the striatum by immunohistochemical analysis using the Dopamine Transporter (DAT) antibody. The histological analysis revealed a severe loss of DAT immunoreactivity in the striatum of $En1^{+/-}/En2^{+/-}$ while a normal distribution of DA fibres was observed in $En2^{+/-}$ littermate controls.

These data confirm that Engrailed partial inactivation in $En1^{+/-}/En2^{+/-}$ mice affects the nigrostriatal system. In particular a reduction in the striatal DA content have been observed without alterations in the number e distribution of mesencephalic dopaminergic neurons. The loss of DA neurotransmission was instead caused by changes in DA reuptake as demonstrated by the loss of striatal DAT immunoreactivity.

Overall our analysis confirms the role of the Engrailed genes in the maintenance of the DA nigrostriatal function e reveals a new model of dopamine depletion.

INTRODUZIONE GENERALE	8
1.INTRODUZIONE.....	11
1.1. Neurotrasmissione e neurotrasmettitori	12
1.1.1 Catecolamine	15
1.2 Dopamina	16
1.2.2 La sintesi della dopamina.....	20
1.2.3 Rilascio dopamina	22
1.2.4 Trasporto attivo e ricaptazione dopamina	23
1.2.5 I recettori dopaminergici	24
1.2.7 Inattivazione della dopamina.....	26
1.3 Sistema mesencefalico dopaminergico	27
1.3.1 Via dopaminergica nigrostriatale.....	29
1.3.2 Via dopaminergica mesolimbica	31
1.3.3 Via dopaminergica mesocorticale.....	32
1.3.6 Sviluppo embrionale del sistema dopaminergico.	33
1.3.7 Ruolo dei geni Engrailed nello sviluppo dei neuroni dopaminergici mesencefalici.	34
1.4 MALATTIA DI PARKINSON	35
1.4.1 Epidemiologia ed Etiopatogenesi.....	35
1.4.2 Aspetti Clinici	36
1.4.3 Modelli sperimentali animali.....	37
2. MATERIALI E METODI	39
2.1 Generazione e Mantenimento dei topi.....	39
2.2 Genotipizzazione.....	39
2.2.1 Estrazione del DNA genomico dalle code dei topi.....	39
2.2.2 Genotipizzazione.....	41
2.3 Tecniche istologiche	42
2.3.1 Immunoistochimica	42
2.3.2 Processo di preparazione di tessuto cerebrale adulto.....	45
2.3.3 Metodica immunoistochimica per la tirosina idrossilasi (TH)45	
2.3.4 Metodica immunoistochimica DAT	47
2.4. Dosaggio della dopamina e dei suoi metaboliti	47
3. SCOPO DELLA TESI	50
4. RISULTATI	52
4.1 Introduzione ai risultati.....	52

4.2 Il topo Engrailed doppio eterozigote.....	54
4.3 Analisi del contenuto dopamina	56
4.4 Analisi immunoistochimica	58
4.5 Analisi immunoistochimica DAT	60
5.DISCOSSIONE	62
6. BIBLIOGRAFIA	66

Introduzione generale

I geni Engrailed, En1 ed En2, sono fattori di trascrizione a omeodominio necessari allo sviluppo ed al mantenimento dei neuroni dopaminergici mesencefalici. I neuroni dopaminergici mesencefalici rappresentano la più importante fonte di dopamina del cervello e controllano funzioni fondamentali quali la gratificazione e l'attività motoria. La neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali rappresenta la caratteristica neuropatologica della Malattia di Parkinson (MP). La malattia di Parkinson è un disturbo neurologico debilitante, che colpisce circa il 2% della popolazione sopra ai 65 anni. È una malattia caratterizzata da sintomi motori quali bradicinesia, tremore, rigidità, instabilità posturale e deficit emozionali e cognitivi. La progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici della Substantia Nigra pars compacta e la conseguente perdita dei terminali nervosi dopaminergici nello striato, sono responsabili della maggior parte dei sintomi motori (Fahn, 2003). La malattia di Parkinson ha rivelato le sue molteplici nature e caratteristiche fisiopatologiche e rappresenta, nella forma sporadica, una malattia definita "complessa", che ha tuttavia nella degenerazione della via nigrostriatale dopaminergica l'alterazione neuropatologica caratterizzante. I modelli animali di patologie del sistema

nervoso centrale rappresentano i fondamenti sperimentali per la comprensione dei meccanismi di fisiopatologia, terapia e prevenzione delle principali malattie neurologiche dell'uomo. I molteplici modelli sperimentali della malattia di Parkinson oggi disponibili, sia indotti da tossine che basati su mutazioni genetiche, hanno portato ad un'accresciuta conoscenza dei meccanismi molecolari intra ed extracellulari che portano alla degenerazione del sistema dopaminergico nigrostriatale.

La recente scoperta della degenerazione dei neuroni dopaminergici in un topo adulto modificato geneticamente ($En1^{+/-}/En2^{-/-}$ o En^{HT}) ha portato all'identificazione di un nuovo possibile modello sperimentale di malattia di Parkinson (Sgadò et al., 2006). La presenza in questo modello di una degenerazione dei neuroni nigrostriatali, spontanea lenta e progressiva, non indotta da tossine esogene, lo rende paragonabile alla forma umana, unico ed innovativo rispetto ai precedenti modelli. Lo studio approfondito e la caratterizzazione di questo modello rappresentano un punto di partenza per la comprensione dei meccanismi compensatori che si attuano nei gangli della base a seguito di una degenerazione nigrostriatale cronica. Il valore predittivo di questi meccanismi compensatori per la malattia di Parkinson potrà avere grandi sviluppi nella diagnosi precoce di malattia, nel trattamento della sintomatologia e nella comprensione dei

marker biologici in fase presintomatica della malattia. Attualmente nessun modello sperimentale, genetico o indotto da tossine, è in grado di riprodurre per intero tutte le caratteristiche fisiopatologiche della malattia di Parkinson, sia sotto l'aspetto clinico che neuropatologico. Tuttavia ciascuno di questi modelli riproduce alcuni aspetti della malattia umana, contribuendo alla conoscenza della sindrome in tutti i suoi aspetti.

In conclusione, l'inattivazione parziale dei due geni *Engrailed* $En1^{+/-}/En2^{-/-}$ produce una perdita progressiva di neuroni dopaminergici che riproduce la neurodegenerazione tipica della malattia di Parkinson (Sgadò et al., 2006); inoltre è stato dimostrato da studi precedenti che la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici mesencefalici è regolata dai geni *Engrailed* in modo gene-dose dipendente.

In questo studio abbiamo effettuato un'analisi approfondita del sistema dopaminergico nigrostriatale in topi $En1^{+/-}/En2^{+/-}$ allo scopo di confermare l'effetto *Engrailed* gene-dose dipendente sulla sopravvivenza dei neuroni dopaminergici mesencefalici, ed evidenziare una eventuale deficienza di dopamina.

1. INTRODUZIONE

Nel sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi i neuroni dopaminergici (DA) mesencefalici costituiscono la maggiore fonte di dopamina, un neurotrasmettitore implicato in disordini mentali e neurologici. I neuroni che rilasciano DA sono anatomicamente e funzionalmente eterogenei, localizzati nel telencefalo, nel diencefalo e nel mesencefalo. I neuroni dopaminergici mesencefalici sono raggruppati in tre nuclei: retrorubrico, Substantia Nigra (SN) ed area tegmentale ventrale (VTA). La SN è anatomicamente distinta in una parte detta pars compacta, dove sono localizzati principalmente i corpi cellulari DA, ed una detta pars reticulata, dove si trovano i dendriti dei neuroni DA (Dalhstrom e Fuxe, 1964). Il sistema dopaminergico mesencefalico è coinvolto in molteplici funzioni fisiologiche tra cui il controllo motorio, la modulazione degli stati affettivi ed emotivi, i meccanismi di ricompensa ed alcune funzioni cognitive superiori. La SN e la VTA sono costituiti da poche decine di migliaia di neuroni DA nei roditori e qualche centinaio di migliaia nei primati, un numero molto esiguo considerato che i neuroni totali nell'encefalo sono centinaia di miliardi. Diverse patologie neurologiche e psichiatriche sono correlate ad alterazioni dei sistemi dopaminergici mesencefalici, alcune

delle quali colpiscono individui nel periodo infantile, adolescenziale e giovanile e nell'età avanzata. Nel SNC dei vertebrati tre grandi circuiti neurali sono controllati dai neuroni dopaminergici mesencefalici i cui corpi cellulari risiedono nella SN e nella VTA: la via nigrostriatale, la via mesocorticale e la via mesolimbica. Questi circuiti presiedono a funzioni fisiologiche di fondamentale importanza per il controllo del movimento e dei comportamenti sociali ed affettivi.

1.1. Neurotrasmissione e neurotrasmettitori

La trasmissione sinaptica è il processo attraverso il quale le cellule nervose comunicano con tutte le altre cellule. I neuroni formano e ricevono in media circa 1000 connessioni sinaptiche; il cervello umano contiene all'incirca 10^{11} neuroni, quindi il numero di connessioni sinaptiche che si formano è intorno a 10^{14} . Fortunatamente il controllo della trasmissione sinaptica è affidato solo a pochi meccanismi di base.

Le sinapsi sono divisibili in due gruppi principali: elettriche e chimiche. Nella sinapsi elettrica il neurone pre-sinaptico e quello post-sinaptico non sono completamente separati così che la corrente elettrica può fluire direttamente dal neurone pre-sinaptico a quello post-sinaptico attraverso

strutture speciali denominate “gap junction” che connettono il citoplasma delle due cellule.

Nelle sinapsi chimiche la separazione delle due cellule impedisce il fluire diretto della corrente, in questo caso la trasmissione avviene mediante dei neurotrasmettitori rilasciati in seguito a cambiamenti del potenziale di membrana del neurone pre-sinaptico. Il neurotrasmettitore diffonde nello spazio sinaptico e va a legarsi a specifici recettori molecolari situati sulla membrana plasmatica della cellula post-sinaptica.

I neurotrasmettitori attivi nel cervello sono suddivisibili in tre classi chimiche: amino acidi, amine biogene e peptidi. Gli aminoacidi con funzione di neurotrasmettitori (GABA, glutamato, glicina) sono anche i costituenti universali delle cellule.

La maggior parte dei neurotrasmettitori lavora nella trasmissione del segnale “lenta”, mentre quelli attivi nella trasmissione sinaptica veloce sono GABA e glutamato. Le due vie di neurotrasmissione interagiscono e non possono essere considerate meccanismi l’uno indipendente dall’altro. A livello del cervello le sinapsi veloci possono esser eccitatorie (mediate dal glutamato) o inibitorie (mediate dal GABA). Essenzialmente la velocità è data dall’abilità del neurotrasmettitore nell’aprire i canali ionici a controllo di ligando presenti sulle membrane delle cellule

post-sinaptiche. Nella trasmissione eccitatoria veloce, il glutamato si lega al proprio recettore, permettendo agli ioni sodio di entrare all'interno della cellula promuovendo un segnale eccitatorio depolarizzante. Al contrario, nelle sinapsi inibitorie, il GABA, legandosi al proprio recettore, ne promuove un cambiamento conformazionale. Questo si traduce in un aumento di permeabilità agli ioni cloro che comporta la generazione di un impulso inibitorio iperpolarizzante.

Il secondo tipo di comunicazione tra cellule nervose, cioè la trasmissione sinaptica lenta, dura da un minimo di cento millisecondi fino a minuti ed è molto più complessa dell'altra. I neurotrasmettitori di questa via promuovono, in seguito all'interazione con i loro specifici recettori, una variazione intracellulare dei secondi messaggeri. A loro volta i secondi messaggeri attivano delle proteine kinasi che mediante fosforilazioni/defosforilazioni cambiano le proprietà di specifici substrati proteici (Greengard, 2001; Girault e Greengard 2004). Inoltre i neurotrasmettitori cosiddetti lenti modulano la neurotrasmissione sinaptica veloce agendo attraverso due principali modalità: (1) attraverso la regolazione del rilascio di neurotrasmettitori mediante fosforilazione al livello delle cellule pre-sinaptiche e (2) attraverso la fosforilazione degli specifici recettori presenti nelle cellule post-sinaptiche.

1.1.1 Catecolamine

Il sistema nervoso centrale contiene neurotrasmettitori aminergici: dopamina (DA), norepinefrina (noradrenalina, NE), 5-idrossitriptamina (5-HT). Queste tre sostanze, insieme all'epinefrina, sono conosciute come amine biogene; dopa, dopamina, norepinefrina e epinefrina sono dette catecolamine in quanto contengono un “nucleo di catecolo” (un anello di benzene con due gruppi idrossilici adiacenti). Hanno un ruolo fondamentale come modulatori nel sistema nervoso centrale dove concorrono a regolare l'effetto di altri neurotrasmettitori (Kandel et al.,2000).

Tutte le catecolamine sono sintetizzate a partire della tirosina, un amino acido essenziale, in una via biosintetica in cui agiscono cinque enzimi principali: la Tirosina idrossilasi (TH), la amino acido aromatico decarbossilasi (AADC), la dopamina β -idrossilasi (DBH), la pteridina reductasi (PtR1) e la feniletanolamina-N-metil transferasi (PNMT). Il primo enzima, la Tirosina idrossilasi, converte la tirosina in L-diidrossi-fenilalanina (L-DOPA). Questo enzima è fondamentale per la sintesi di dopamina e norepinefrina ed è quindi finemente regolato al livello delle cellule catecolaminergiche. L'espressione dei cinque enzimi varia secondo i sottogruppi cellulari, quindi i neuroni che rilasciano norepinefrina non esprimono la metiltransferasi, mentre quelli che rilasciano dopamina mancano sia della transferasi che della dopamina β -idrossilasi (Kumer e

Vrana, 1996). A livello del cervello ritroviamo un'elevata concentrazione di catecolamine riunite in regioni specifiche dette nuclei.

Nel sistema nervoso centrale le cellule contenenti norepinefrina sono contenute in un piccolo nucleo denominato *locus coeruleus* mentre quelle contenenti 5-idrossitriptamina in gruppi di cellule chiamate *nuclei del rafe* (Foote et al., 1983). La maggior parte delle cellule che contengono dopamina è localizzata in due nuclei a livello del mesencefalo ventrale, la *Substantia Nigra* e il *tegumento ventrale* (Dahlstrom e Fuxe, 1964; Fuxe, 1965; Ungerstedt, 1971; Lindvall e Bjorklund, 1974; Bjorklund e Hokfelt, 1984).

1.2 Dopamina

Più della metà del contenuto in catecolamine del SNC è costituito da dopamina. Grandi quantità si trovano nei gangli della base, soprattutto nel nucleo caudato-putamen, nel nucleo accumbens, nel tubercolo olfattorio, nel nucleo centrale dell'amigdala, nell'eminenza mediana e in alcune zone della corteccia frontale.

1.2.1 Neuron dopaminergici

In dettaglio i neuroni contenenti dopamina possono essere suddivisi in tre tipi morfologicamente distinti tra loro (Moore e Bloom, 1978):

- 1) Neuron con assoni ultracorti;
- 2) Neuron con assoni di lunghezza intermedia;
- 3) Neuron dalle lunghe proiezioni.

1) Neuron con assoni ultracorti, come quelli delle cellule amacrine, collegano gli strati plessiformi interno ed esterno della retina. Quelli periglomerulari del bulbo olfattorio collegano i dendriti delle cellule mitrali che si trovano in glomeruli adiacenti tra loro.

2) Neuron con assoni di lunghezza intermedia, come quelli dell'ipotalamo mediobasale, proiettano dai nuclei arcuato e periventricolare dell'ipotalamo verso l'eminenza mediana ed il lobo intermedio dell'ipofisi e liberano dopamina direttamente nei vasi del sistema portale ipofisario (Bjorklund and Falck, 1969; Bjorklund et al., 1975). La dopamina raggiunge così recettori di tipo D2 presenti nelle cellule mammotrope dell'ipofisi anteriore, inibendo la secrezione di prolattina. Il blocco della trasmissione dopaminergica a questo livello è responsabile dell'iperprolattinemia e dei disturbi ad essa associati in

corso di terapia con farmaci che antagonizzano i recettori di tipo D2. Altri neuroni con assoni di lunghezza intermedia sono quelli incertoipotalamici che connettono l'ipotalamo dorsale e posteriore con il nucleo laterale del setto e con il nucleo ipotalamico dorsale anteriore e, infine, quelli della midollare periventricolare che includono quei neuroni dopaminergici lungo il perimetro del nucleo motorio dorsale del vago, il nucleo del tratto solitario e le cellule distribuite nella sostanza grigia periacqueduttale.

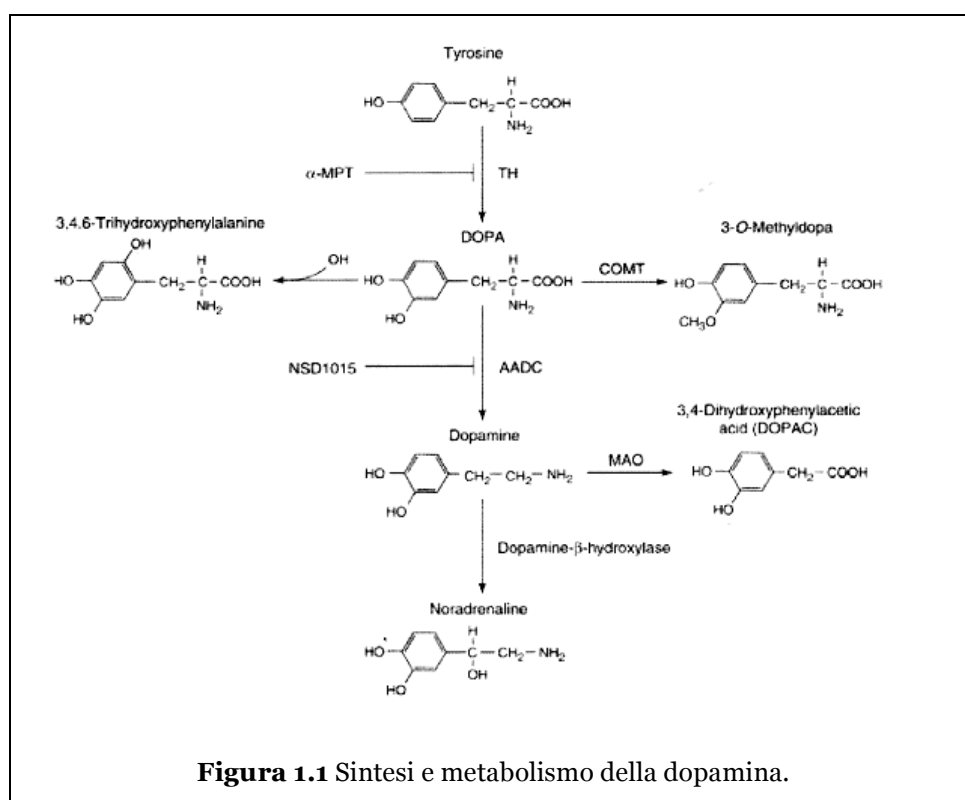
3) Neuroni dalle lunghe proiezioni i cui corpi cellulari sono localizzati nella pars compacta della Substantia Nigra (SNpc) del mesencefalo e proiettano le loro terminazioni a livello del neostriato (principalmente il nucleo caudato e il putamen; Fallon e Moore, 1978). Il sistema dopaminergico nigrostriatale fa parte del sistema extrapiramidale, la cui funzione principale è quella di controllare il tono muscolare e la coordinazione motoria. La degenerazione dei corpi cellulari di questi neuroni rappresenta la causa principale della Malattia di Parkinson, che si manifesta con rigidità, tremori e acinesia (Fallon e Moore, 1978; Gerfen et al., 1985; Hirsch et al., 1992; Parent e Lavoie, 1993; Haber et al., 1995). Altri neuroni dalle lunghe proiezioni sono quelli che partono dall'area ventrale tegmentale (VTA) del mesencefalo, in minor misura, dalla parte mediale della Substantia Nigra. Le loro fibre vanno a innervare la corteccia limbica (media prefrontale; cingolata; entorinale)

(via mesocorticale) e altre strutture limbiche (nucleo laterale del setto; tubercolo olfattorio; setto del nucleus accumbens; complesso amigdaloidale; corteccia piriforme) (via mesolimbica). Le cellule dopaminergiche della regione ventro-tegmentale ricevono segnali disparati e numerosi neurotrasmettitori e peptidi sono stati rilevati in quest'area. La distruzione selettiva di queste cellule tramite impulsi a radio-frequenza produce una complessa sindrome comportamentale caratterizzata da iperattività locomotoria con ridotta esplorazione; profondi deficit nella capacità di regolare il comportamento; soppressione di comportamenti innati considerati fondamentali per la sopravvivenza del singolo e della specie, incapacità di apprendere mediante stimoli condizionati di tipo avversivo, ridotta autostimolazione intracranica e autosomministrazione di sostanze d'abuso. Tali deficit sono correlati con una riduzione dei livelli di dopamina nella corteccia frontale antero-mediale e, in misura minore, nel nucleus accumbens ma non nel caudato-putamen o con i livelli di serotonina o noradrenalina che, viceversa, restano nella norma in ciascuna di queste regioni. Questo sistema è ritenuto quello maggiormente implicato nel controllo delle funzioni cerebrali superiori e delle emozioni (Farmacologia generale e molecolare, Clementi; UTET, 1999).

1.2.2 La sintesi della dopamina

La dopamina viene sintetizzata, come tutte le catecolamine, a partire dalla tirosina, un aminoacido normalmente presente nella dieta, che deve attraversare la barriera ematoencefalica quindi venire attivamente concentrato nel neurone dopaminergico (Farmacologia generale e molecolare, Clementi; UTET, 1999).

Il primo passaggio, che è anche la tappa limitante nella sintesi della dopamina, è rappresentato dall'aggiunta di un secondo ossidrile all'anello benzenico della tirosina. In questo modo la tirosina viene trasformata in L-DOPA (L-diidrossifenilalanina) ad opera della tirosina idrossilasi



(TH). Lo stadio successivo nella sintesi del neurotrasmettitore è la trasformazione della DOPA in dopamina ad opera della DOPA-decarbossilasi, che rimuove il gruppo carbossilico (-COOH) dalla catena laterale della DOPA (Figura 1.1). Questo enzima non è specifico per la DOPA, potendo decarbossilare altri aminoacidi dotati di un anello benzenico (ed è perciò genericamente definito aminoacido decarbossilasi) ed è così rapido che non viene mai saturato dal substrato. Ciò ha un'importante implicazione farmacologica; proprio perché la DOPA-decarbossilasi è un enzima ad altissima affinità ed è normalmente non saturato, i livelli endogeni di L-DOPA sono praticamente nulli, è quindi possibile potenziare in modo considerevole la sintesi di dopamina mediante la somministrazione esogena di DOPA. Si tratta tuttavia di un aumento aspecifico di dopamina in tutte le aree che contengono attività enzimatica della DOPA-decarbossilasi e non invece in quelle regioni dove si vorrebbe ottenere un potenziamento selettivo della trasmissione dopaminergica. Viceversa, i livelli di tirosina sono relativamente alti nel SNC e, di solito, a concentrazioni più elevate della K_m della TH ed è pertanto illogico aspettarsi un aumento della sintesi di dopamina aumento i livelli di tirosina nella dieta. Visto il suo ruolo fondamentale nella sintesi della dopamina la TH è sotto il controllo di diversi fattori:

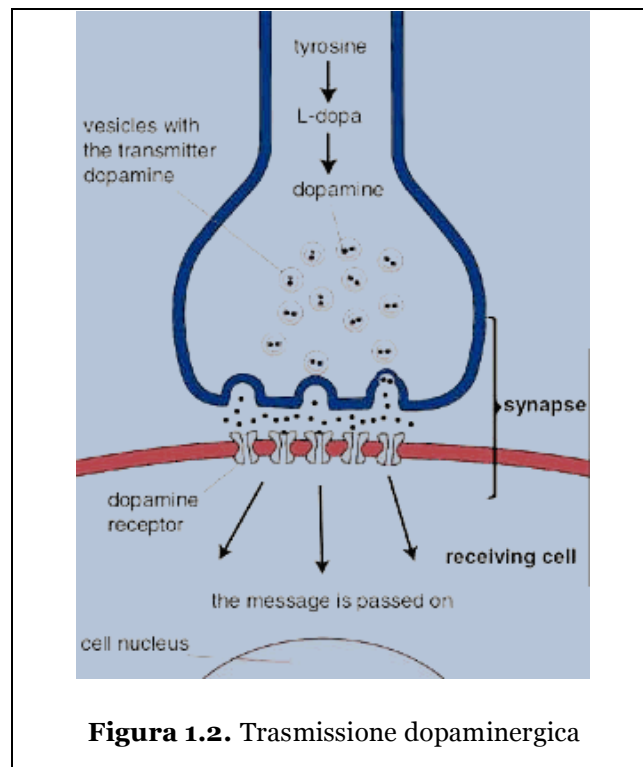
a) la dopamina e le altre catecolamine ne inibiscono l'attività (inibizione da prodotto finale) competendo con il cofattore tetraidrobiopterina (BH-4);

b) la TH viene trasformata nella forma attiva, che ha una maggiore affinità per il BH-4, mediante una reazione di fosforilazione, che è regolata dall'attività del neurone presinaptico;

c) i recettori dopaminergici presinaptici, che rappresentano importanti siti d'azione per la manipolazione farmacologica della trasmissione dopaminergica, sono in grado di modulare la sintesi e rilascio di dopamina nello spazio sinaptico.

1.2.3 Rilascio dopamina

La dopamina così sintetizzata nel citoplasma viene catturata e concentrata all'interno delle vescicole sinaptiche attraverso un processo di trasporto attivo (Figura 1.2). L'immagazzinamento all'interno delle vescicole ha lo scopo di proteggere la molecola dalla distruzione enzimatica ad opera della monoaminossidasi (MAO), ed è essenziale per il processo di rilascio del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico mediato dall'impulso nervoso. All'arrivo di questo, le vescicole che sono accumulate nella terminazione nervosa, per effetto dell'onda di depolarizzazione, fondono



la loro membrana con quella del neurone e si aprono, svuotando il loro contenuto nello spazio sinaptico, in un processo dinamico che richiede la contemporanea mobilitazione di ioni calcio. La quota (quantum) di dopamina rilasciata nello spazio sinaptico è funzione della frequenza e del tipo di attività neuronale

1.2.4 Trasporto attivo e ricaptazione dopamina

La membrana delle terminazioni dopaminergiche possiede delle proteine altamente specializzate nel trasportare la dopamina in entrambe le direzioni ed in relazione al gradiente di concentrazione presente sulle due facce della

membrana. Tali meccanismi di trasporto specifico sono in grado di influenzare la trasmissione dopaminergica, ricaptando rapidamente la dopamina dallo spazio sinaptico verso il terminale nervoso. Il trasportatore della dopamina (DAT) è una proteina di 619 aminoacidi che appartiene alla famiglia delle pompe plasmatiche Na^+/Cl^- che utilizzando l'energia del gradiente del Na^+ generata dalla ATPasi scambiatrice Na^+/K^+ ricattura la dopamina immediatamente dopo il suo rilascio nello spazio sinaptico. Una volta liberata nello spazio sinaptico, la dopamina diffonde lungo la sinapsi e interagisce con i recettori specifici situati nella membrana postsinaptica. L'interazione del neurotrasmettitore con il recettore dà luogo a tutta una serie di eventi nel neurone che sono diversi a seconda del tipo di recettore dopaminergico interessato e che conducono a differenti risposte biologiche (vedi Sezione 1.1).

1.2.5 I recettori dopaminergici

A livello molecolare l'effetto della dopamina dipende dall'espressione di specifici recettori e dalla loro modulazione anche da parte di altri neurotrasmettitori (Kebabian and Greengard, 1971). Due tipi di recettori dopaminergici, denominati D1 e D2 sono stati identificati sulla base delle loro differenti caratteristiche farmacologiche e biochimiche, con una diversa affinità di

legame sia per la stessa dopamina che per molti altri agonisti ed antagonisti, naturali o di sintesi (Kandel et al., 2000). Per ragioni di nomenclatura è stato recentemente proposto che le famiglie dei recettori dopaminergici siano identificate rispettivamente con la sigla D1 e D2 mentre i singoli recettori siano definiti come D1, D2, D3, D4, D5 . I recettori D1 e D5 possiedono una farmacologia di tipo D1, mentre i recettori D2, D3 e D4 sono assimilabili da una farmacologia di tipo D2. I recettori tipo D1 attivano l'adenilato ciclasi e attraverso di essa mediano la fosforilazione di una proteina denominata DARPP-32 (Sidhu, 1998); mentre quelli tipo D2 inibiscono l'adenilato ciclasi.

Dei recettori dopaminergici sinora clonati quelli D2 sono più abbondantemente espressi nel mesencefalo dove hanno una funzione nella regolazione di numerose attività e del rilascio di dopamina (Greengard, 2001). In questa regione le cellule che esprimono il mRNA per i D2 sono quelle della Substantia Nigra pars compacta e della VTA. Il messaggero per i recettori D2 è altamente espresso anche nella parte caudale della sostanza reticolare, nel nucleo magnocellulare della via rubro-spinale e nel grigio periacquedottale. Un alto livello di binding (proteine) per i recettori D1 viene rilevato nella Substantia Nigra pars reticulata, ma nessuna cellula presenta livelli misurabili di mRNA per questi recettori né nella Substantia Nigra pars

reticulata né nella VTA. Questi recettori sono localizzati su terminazioni nervose di neuroni GABAergici, il cui corpo cellulare è localizzato nello striato (neuroni nigrostriatali). Questi recettori D1 sono stimolati dalla dopamina liberata dalle varicosità dei dendriti dei neuroni dopaminergici. Il messaggero per i recettori D2 è altamente espresso in numerosi nuclei del rafe dove potrebbe avere un ruolo nel regolare il rilascio di serotonina (Kebabian e Greengard, 1971)

1.2.7 Inattivazione della dopamina

L'azione della dopamina liberata nello spazio sinaptico viene rapidamente bloccata attraverso diversi meccanismi, il più importante dei quali è la ricaptazione della dopamina da parte della terminazione nervosa da cui è stata liberata, cui segue la trasformazione enzimatica in DOPAC ad opera della MAO intraneuronale, un enzima localizzato nella membrana esterna dei mitocondri presenti nella terminazione nervosa dopaminergica. La dopamina deaminata dalla MAO diviene 3,4-diidrossi-fenil-acetaldeide (DHPA), ed è quindi trasformata per opera di un'aldeide deidrogenasi in acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC). La dopamina rilasciata nello spazio sinaptico può anche essere inattivata e trasformata in acido omovanillico (HVA) al di fuori del neurone mediante una

doppia conversione enzimatica tramite la catecol-O-metiltrasferasi (COMT) prima e la MAO poi. Il catabolismo della dopamina può anche aver luogo a livello della sinapsi. In questo caso la dopamina viene metilata in posizione 3 dell'anello benzenico dalla COMT e trasformata in 3-metossitiramina, (3MTA). Quest'ultima viene poi deaminata dalla monoaminossidasi e forma la 3-metossi-4-idrossi-fenilacetaldeide (3MHPA), la quale viene trasformata dall'aldeide deidrogenasi in HVA. Nel ratto il DOPAC rappresenta il principale metabolita della dopamina e quantità misurabili di HVA e DOPAC sono presenti sia nella forma libera che sulfo-coniugata, mentre nei primati il principale metabolita della dopamina è l'HVA, di cui solo una piccola parte si trova nella forma coniugata. Parte della dopamina ricatturata non viene distrutta, ma è trasportata all'interno delle vescicole, pronta per essere di nuovo rilasciata.

1.3 Sistema mesencefalico dopaminergico

Da un punto di vista evoluzionistico, il sistema di neurotrasmissione dopaminergico risulta essere uno dei più primitivi ed è infatti presente nella maggior parte dei sistemi animali. Le maggiori proiezioni del sistema dopaminergico mesencefalico sono a livello dei gangli della base dove la dopamina gioca un ruolo cruciale nel controllo

del comportamento e delle funzioni motorie (Bjourklund e Fulck, 1969; Bjourklund et al., 1975). I gangli della base sono nuclei di sostanza grigia costituiti da: nuclei caudato e putamen (striato dorsale o neostriato, CPu), il segmento interno e quello esterno del globus pallidus (GPi e GPe), la pars reticulata e quella compacta della Substantia Nigra (SNr e SNc) ed il nucleo subtalamico (STh). Il neostriato è la principale porta di ingresso dei gangli della base e riceve fibre da tutta la corteccia cerebrale, dai nuclei intralaminari del talamo e dal mesencefalo (Joel e Weiner, 2000). Lo striato è suddiviso anatomicamente in base alle proiezioni corticostriatali in: striato motorio, associativo e limbico. Lo “striato motorio” riceve input dalla corteccia motoria ed è localizzato nella porzione dorsolaterale del nucleo caudato e del putamen. Lo “striato associativo” riceve input da aree associative della corteccia e comprende la porzione mediale del nucleo caudato e putamen. Lo “striato limbico” è costituito dalle regioni che ricevono input da aree limbiche come l'ippocampo, l'amigdala e aree corticali deputate alle funzioni limbiche. Lo striato limbico è localizzato nella parte ventrale dei nuclei caudato e putamen e dal nucleo accumbens. Questa suddivisione anatomico-funzionale si rispecchia anche nelle proiezioni dopaminergiche mesencefaliche.

I nuclei dei gangli della base sono interconnessi attraverso numerosi circuiti “interni” che integrano l'informazione

proveniente da diverse aree della corteccia con la neuromodulazione dopaminergica mesencefalica.

Le efferenze dei gruppi cellulari dopaminergici sono state utilizzate per definire la nomenclatura del sistema dopaminergico:

1) il sistema “nigrostriatale” origina nelle cellule A9 e proietta verso il nucleo caudato e putamen;

2) il sistema "mesolimbico" i cui neuroni originano nell'area A10 e proiettano verso strutture associate con il sistema limbico, la cui parte principale è costituita dal nucleus accumbens, mentre altre proiezioni sono rappresentate nel tubercolo olfattorio, nel setto laterale, nel nucleo della stria terminale, nell'ippocampo, nell'abenula, nell'amigdala e nella corteccia entorinale;

3) Il sistema “mesocorticale” composto da neuroni che originano da diversi gruppi mesencefalici di cellule dopaminergiche e proiettano a più aree corticali.

1.3.1 Via dopaminergica nigrostriatale

I sottogruppi dopaminergici sono stati classificati in relazione alle loro diverse caratteristiche quali la distribuzione topografica nel mesencefalo, il pattern di arborizzazione degli assoni, e l'organizzazione sinaptica

(Gerfen, 2004). In base alla suddivisione funzionale dello striato (vedi paragrafo precedente), determinata dalle innervazioni corticostriatali, lo “striato motorio” è innervato dalla porzione laterale della SNc, lo “striato associativo” dalla porzione mediale della SNc e dal VTA mentre lo “striato limbico” è innervato da neuroni del VTA (Joel and Weiner, 2000).

Gli assoni della via nigrostriatale sono costituiti prevalentemente da due tipi di fibre: (1) fibre lisce e sottili, con un numero limitato di varicosità (bottoni sinaptici) che derivano dal “dorsal tier” e terminano nella matrice striatale. (2) fibre leggermente più spesse, con numerose varicosità, che derivano dal “ventral tier” e innervano gli striosomi (Fallon e Moore, 1978). La presenza delle varicosità e la loro organizzazione anatomica è fondamentale per l'individuazione dei siti di rilascio di dopamina in quanto rispecchia il grado di neurotrasmissione dopaminergica presente.

Quando i recettori dopaminergici vengono bloccati nelle proiezioni postsinaptiche di questo sistema, si producono disturbi del movimento molto simili a quelli del morbo di Parkinson. Gli effetti collaterali associati al blocco dei recettori dopaminergici di quell'area sono generalmente chiamati reazioni extrapiramidali. Da un punto di vista descrittivo, si tratta di una rigidità priva di movimenti chiamata "neurolepsi". Il termine "neurolettico" venne

coniato dai primi clinici che osservarono la sindrome comportamentale causata quando vengono somministrati ai pazienti dei farmaci antipsicotici, cioè rallentamento psicomotorio oltre che quiete emotiva ed indifferenza affettiva. Nell'uomo e negli animali, i farmaci antipsicotici neurolettici che bloccano i recettori dopaminergici della via nigrostriatale causano disturbi del movimento quali acatisia (un tipo di irrequietezza), distonia (movimenti di contrazione specialmente della faccia e del collo), tremore, rigidità, e acinesia/bradicinesia (cioè, mancanza o rallentamento del movimento).Ovviamente, questi effetti dei neurolettici sono indesiderati, e sono parte del prezzo che si deve pagare per ottenere gli effetti terapeutici che derivano dal contemporaneo blocco dei recettori dopaminergici postsinaptici della via mesolimbica.

1.3.2 Via dopaminergica mesolimbica

La via mesolimbica invia input dopaminergici allo striato limbico, allo striato ventrale e alla parte ventromediale dei nuclei caudato e putamen (Ungerstendt, 1971). Gli assoni dopaminergici originano dal VTA e dal SNc mediale e vanno a stabilire contatti sinaptici sia con neuroni GABAergici che con interneuroni. La via mesolimbica è responsabile del controllo del comportamento. Gli assoni DA originati nella VTA innervano prevalentemente

specifiche aree corticali (corteccia prefrontale mediale, giro del cingolo, area entorinale) e strutture del sistema limbico (il nucleo accumbens, il tubercolo olfattorio, l'amigdala, la corteccia piriforme). Queste due vie, largamente sovrapposte, sono coinvolte nel controllo dell'umore, dell'affetto, delle emozioni e nei comportamenti sociali (Schultz, 1997; Williams e Goldman-Rakic, 1998). Disturbi in questo sistema sono associati alla schizofrenia, a stati allucinatori, con sindromi depressive (Egan e Weinberger, 1997), e a sindromi da dipendenza da alcune droghe d'abuso.

1.3.3 Via dopaminergica mesocorticale

Il sistema mesocorticale è associato alla modulazione dei normali processi cognitivi e delle disfunzioni cognitive che caratterizzano le sindromi psichiatriche. Le proiezioni mesocorticali originano da diversi gruppi di cellule dopaminergiche e proiettano a diverse aree corticali. Ad esempio molte delle proiezioni DA della corteccia prefrontale originano dal VTA. Alcuni ricercatori credono che questa via sia coinvolta insieme a quella mesolimbica nella mediazione dei sintomi psicotici positivi, e forse anche in quelli negativi.

La distinzione di queste tre vie DA non va considerata in modo rigido, dal momento che esistono riconosciute sovrapposizioni di fibre dell'una e dell'altra via. Questo dato ha importanti implicazioni cliniche poiché lesioni di una via comportano anche disturbi nelle altre funzioni DA.

1.3.6 Sviluppo embrionale del sistema dopaminergico.

La specificazione dei diversi neuroni nei vari distretti cerebrali si acquisisce attraverso una serie di eventi in sequenza spazio-temporale e l'espressione del programma genico intrinseco ad ogni neurone è modulata da fattori epigenetici come fattori solubili, interazioni con le altre cellule o con proteine della matrice extracellulare ed attività elettrica. Nei roditori lo sviluppo dei neuroni dopaminergici mesencefalici è comparabile a quello dei primati, sebbene la cronologia sia diversa nelle differenti specie. I dettagli degli eventi che portano alla specificazione e al differenziamento dei neuroni dopaminergici mesencefalici non verranno discussi in questa sede. Un breve riferimento ai geni *Engrailed* è però necessario per la comprensione dei risultati riportati in questa tesi.

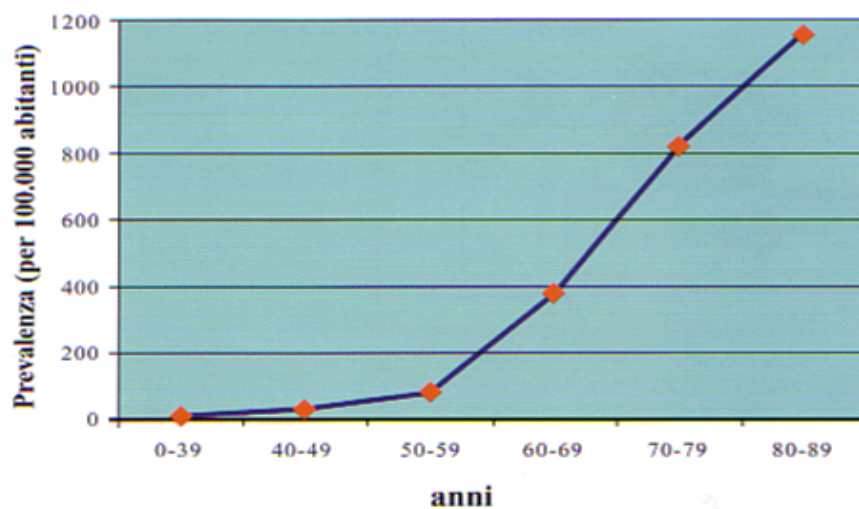
1.3.7 Ruolo dei geni Engrailed nello sviluppo dei neuroni dopaminergici mesencefalici.

I geni Engrailed sono fattori di trascrizione a omeodominio espressi in tutti i neuroni dopaminergici del mesencefalo dalla differenziazione postmitotica fino all'età adulta. Sono stati riconosciuti come fattori indispensabili allo sviluppo e al mantenimento dei neuroni dopaminergici mesencefalici durante l'embriogenesi (Alberi et al., 2004). Nei topi i cui geni Engrailed sono mutati, è stato osservato un effetto gene-dose dipendente in relazione alla sopravvivenza dei neuroni dopaminergici mesencefalici; ciò indica che questi geni svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento della popolazione dopaminergica embrionale e matura (Simon et al., 2001; Alberi et al., 2004, Sgadò et al., 2006).

1.4 MALATTIA DI PARKINSON

1.4.1 Epidemiologia ed Eziopatogenesi

La malattia di Parkinson esordisce in età media o avanzata, in genere dopo i 40 anni. Ha una distribuzione omogenea nei due sessi, una prevalenza globale dello 0.2% ed una prevalenza del 1-3% dopo i 65 anni.



Tassi di prevalenza per classi di età nella Malattia di Parkinson; si nota l'aumento nei gruppi di età più avanzata

La malattia di Parkinson sporadica e idiopatica costituisce il 75% circa di tutti i casi di parkinsonismo: il restante 25% ha un'eziologia geneticamente definita o è dovuta ad altre cause, fra le quali diverse patologie neurodegenerative, malattie cerebrovascolari e farmaci. I gruppi familiari di forme autosomiche dominanti e recessive di malattia di Parkinson comprendono il 5% circa dei casi. Questi ultimi sono caratterizzati da un'età di esordio più precoce (tipicamente prima dei 50 anni) e da un decorso più

prolungato rispetto alle forme tipiche “sporadiche” di malattia di Parkinson.

1.4.2 Aspetti Clinici

L'esordio è insidioso. La malattia può insorgere sottoforma di dolori non sistemizzati e una certa affaticabilità. La sintomatologia comprende una triade caratteristica di sintomi: tremore a riposo, bradicinesia e ipertonìa.

Nell'80% dei casi il tremore è il primo sintomo di insorgenza, anche se la bradicinesia può occasionalmente essere il primo segno di malattia e il tremore può anche non presentarsi mai. Si tratta di un tremore in prevalenza unilaterale, a riposo, che scompare con l'esecuzione di un movimento volontario.

La manifestazione clinica più invalidante è la bradicinesia (o, nella forma più severa, l'acinesia), che consiste in un rallentamento dei movimenti volontari con riduzione dei movimenti automatici sincinetici quali i movimenti pendolari delle braccia durante la deambulazione.

L'ipertonìa parkinsoniana si caratterizza per la qualità plastica e per la sua distribuzione, tale da realizzare un atteggiamento generale in flessione, che il soggetto parkinsoniano mantiene in tutte le sue attività, in particolare nella marcia. La deambulazione è a piccoli passi, sono assenti i movimenti pendolari degli arti, vi è instabilità posturale (soprattutto nel cambiamento di direzione) e spesso è presente una difficoltà a fermarsi. La

rigidità è anche definita come aumento delle resistenze alla mobilizzazione passiva ed è frequente.

I malati possono anche presentare dolori, disturbi vegetativi e uno stato depressivo che può essere considerato di tipo psicoreattivo.

L'evoluzione naturale è lenta ma inesorabilmente progressiva nel senso dell'aggravamento; la durata media di sopravvivenza è di circa dieci anni.

I sintomi tendono a peggiorare col tempo, portando, se non trattati, a gravi danni motori, fino all'immobilizzazione. I sintomi precoci della malattia di Parkinson sono correlati alla progressiva perdita di dopamina a livello della via nigrostriatale, con il conseguente deficit della neurotrasmissione dopaminergica a livello dello striato (Albin et al., 1998; Mink e Thach, 1993; Wichmann e De Long 1993). Questi sintomi possono migliorare mediante il trattamento con Levodopa e con agonisti dopaminergici. Man mano che la malattia progredisce, si sviluppano sintomi che non rispondono alla Levodopa, come la postura in flessione, il fenomeno del "freezing" e la perdita dei riflessi posturali. Inoltre la bradicinesia, che inizialmente risponde alla Levodopa, aumenta col tempo e non risponde completamente al trattamento.

1.4.3 Modelli sperimentali animali

Va sottolineato che ad oggi, tutte le terapie usate nella cura della Malattia di Parkinson sono sintomatiche, mirano

quindi a limitare i disturbi motori caratteristici, mentre non hanno effetto sulla progressiva neurodegenerazione nigrostriatale. A questo scopo sarebbe invece opportuno sviluppare terapie neuroprotettive per rallentare o arrestare la neurodegenerazione e quindi prevenire l'insorgere della causa prima dei sintomi. Tuttavia, lo sviluppo di tali terapia è limitato dalla conoscenza degli eventi fisiopatologici alla base della neurodegenerazione.

Da qui risulta evidente l'importanza dei modelli animali, fondamentali nella comprensione dei meccanismi fisiopatologici delle malattie neurodegenerative e nella sperimentazione di eventuali cure future.

I modelli animali esistenti, sia quelli in cui vengono utilizzate neurotossine che quelli derivanti da manipolazioni genetiche per indurre il fenotipo parkinsoniano, si sono dimostrati fondamentali per comprendere meglio i meccanismi molecolari che stanno alla base di questa patologia. Attualmente, nessun modello consente di riprodurre completamente tutte le caratteristiche di progressività e specificità della neurodegenerazione nigrostriatale, sebbene ognuno di essi possa far luce su alcune caratteristiche, contribuendo alla conoscenza sulla patogenesi della malattia umana.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Generazione e Mantenimento dei topi

La generazione dei topi mutanti per il gene *En2* mediante una delezione selettiva del gene è già stata precedentemente descritta (Joyner et al., 1991). I topi *En1*^{tauLacZ} sono stati generati usando una tecnica “knock-in” dove i primi 71 codoni del gene *En1* sono stati sostituiti dalla sequenza tauLacZ (Callahan e Thomas, 1994). Come risultato l'espressione del gene *En 1* è stata sostituita dall'espressione della β -galattosidasi (Saueressig et al., 1999). Le due linee parenterali sono state incrociate in modo da ottenere una linea transgenica, che presenta mutazioni in entrambi i geni *Engrailed*, *En1*^{tauLacZ/+}/*En2*^{-/+}.

2.2 Genotipizzazione

2.2.1 Estrazione del DNA genomico dalle code dei topi

La caratterizzazione del genotipo dei topi adulti è stata effettuata mediante l'amplificazione di una parte di genoma contenente il frammento mutato (Callahan e Thomas, 1994; Joyner et al., 1991).

Il DNA genomico per l'amplificazione è stato isolato da biopsia di tessuto. Sono stati asportati circa 0,5-1,5 cm dalla coda di ogni topo e ciascuno è stato messo in un tubo eppendorf da 1.5 ml. Ad ogni tubo sono stati aggiunti 500 µl di soluzione buffer, preparata in precedenza con: 50 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl e SDS 1% e 7,5 µl di proteinasi K.

I tubi sono quindi stati lasciati in agitazione con le seguenti modalità: a 200 rpm, a 55° per una notte, finchè il tessuto non è stato completamente digerito. Mettere i campioni in agitazione accelera il processo di digestione, la cui durata dipende anche dalla dimensione delle biopsie. In ogni tubo sono stati aggiunti 150 µl di NaCl 6M. I tubi sono stati poi messi a centrifugare a massima velocità, 14000 rpm per 10 minuti. A centrifugazione ultimata, è stato aspirato il sovranatante e trasferito in altrettanti tubi eppendorf da 1.5 ml. A 500µl di campione sono stati aggiunti 500µl di etanolo al 100% per permettere la precipitazione del DNA genomico. In altrettanti tubi nuovi sono stati aggiunti 200µl di Tris 10 mM pH 7.4, in cui è stato poi trasferito il flocculo di DNA precipitato. Il DNA viene quindi scaldato in agitazione a 55°C overnight e usato per la genotipizzazione.

2.2.2 Genotipizzazione

La genotipizzazione delle linee mutanti En1-En2 viene effettuata mediante PCR utilizzando due set di primer per i geni Engrailed. Gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione sono: per il gene En1 "En1 s224" 5'-TTC GCT GAG GCT TCG CTT TG-3' e "Tau as853" 5'-GTG TCC GGC AGC TTG GTC TT-3' che riconoscono il transgene En1tauLacZ, in combinazione con un paio di oligonucleotidi che riconoscono l'allele En1 wildtype "En1 s335" 5'-GCC GCT TCT CGT TGT TC-3' e "En1 as1504" 5'-CGG CAC GCT GTC TCC ATC-3'; per il gene En2 "En2 sNeo" 5'-TCT CAT GCT GGA GTT CTT CG-3' e "En2 asNeo" 5'-TTG AGA AGA GAG GCC CTG TA-3', che riconoscono l'allele mutato, in combinazione con una coppia di oligonucleotidi per l'allele wild-type "En2 s3408" 5'-TAA CCT CTG CCC TTT CTC-3' e "En2 as4398" 5'-GCG CTT CCT ACA GTG CT-3'.

2.3 Tecniche istologiche

2.3.1 Immunoistochimica

L'immunoistochimica nasce dall'unione di tecniche immunologiche ed istochimiche e permette di rivelare ed interpretare la presenza di specifici antigeni all'interno di un contesto morfologico.

Le metodiche più comunemente impiegate oggi in immunoistochimica sono quelle immunoenzimatiche (figura 2.1); queste metodiche hanno in comune l'impiego di enzimi che agiscono su un substrato e originano un prodotto di reazione che a sua volta modifica una sostanza colorata (cromogeno) consentendo così di visualizzare la

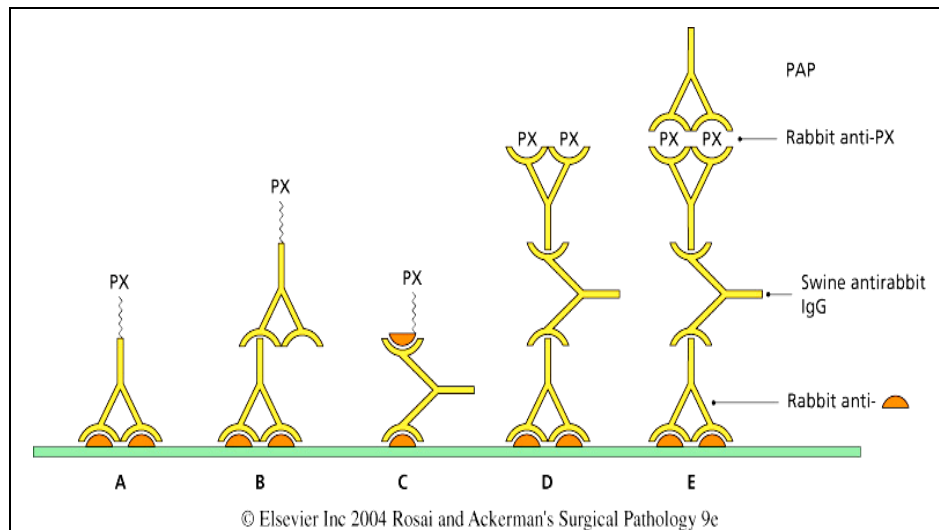
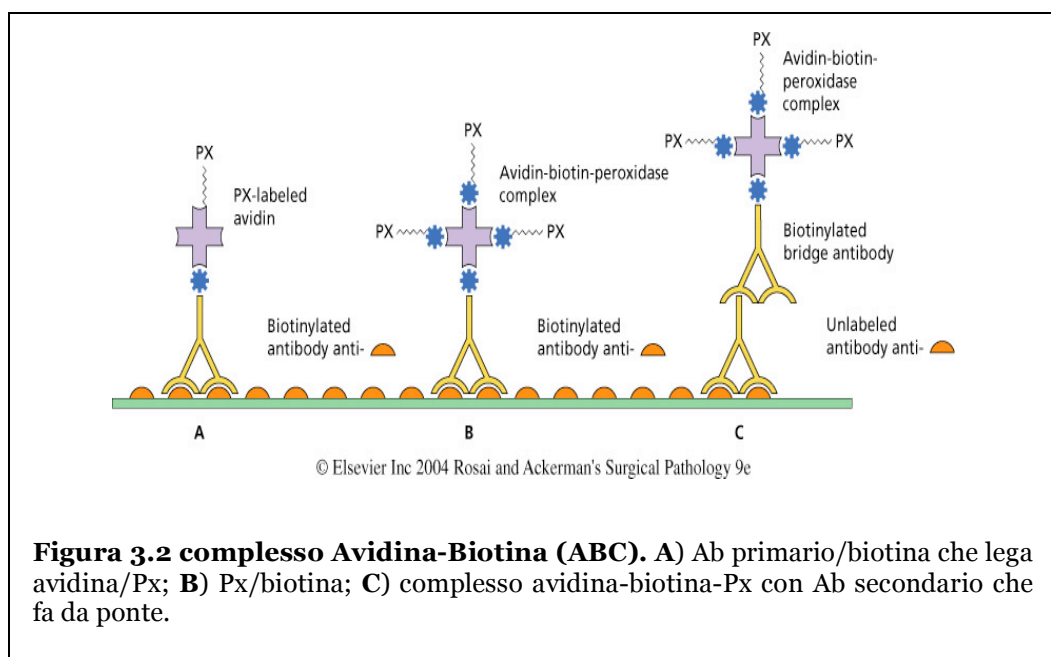


Figura 2.1 Immunoperossidasi A) metodo diretto, Ab primario/perossidasi (Px); B) metodo indiretto, Ab secondario/Px; C) Ag/Px; D) metodo indiretto con Ab secondario non coniugato che fa da ponte tra Ab primario e Ab contro Px; E) metodo PAP (Px-anti-Px).

reazione. Gli enzimi più comunemente usati sono: la perossidasi (PM=40 kD, estratto dal rafano, presente in tessuti e cellule umane, che si lega all'anticorpo (Ab) con legami covalenti ed utilizza come substrato in genere l'acqua ossigenata e come cromogeni la diaminobenzidina (DAB) o l'amminoetilcarbrazolo (AEC); la fosfatasi alcalina, estratta dall'intestino bovino, presente in cellule e tessuti umani che si lega all'Ab con legami covalenti ed ha come substrato gli esteri fosforici e come cromogeno i sali di tetrazolio.

La metodica degli immunocomplessi è quella attualmente più usata: il complesso avidina-biotina (ABC) rappresenta un sistema di rivelazione che sfrutta la capacità della biotina (vitamina H) di legarsi all'avidina, una glicoproteina dell'albume d'uovo; un' avidina lega quattro



biotine (Figura 3.2). Questo sistema di rivelazione definito di amplificazione, aumenta la sensibilità e cioè permette la rivelazione di quantità più piccole di antigene (Ag) con la stessa quantità di Ab o permette la rivelazione della stessa quantità di Ag con una diminuita quantità di Ab. Come sistema cromogeno per la visualizzazione di strutture antigeniche in sezioni congelate viene utilizzata la 3,3-diaminobenzidina (DAB), un substrato della perossidasi che dà luogo alla formazione di un prodotto finale marrone insolubile in alcool.

Gli enzimi più comunemente usati (perossidasi e fosfatasi alcalina) sono normalmente presenti nei tessuti e questo può ridurre la specificità della colorazione. Per ovviare a questo problema è necessario inattivare gli enzimi endogeni pretrattando i campioni da colorare con inibitori degli enzimi, acqua ossigenata nel caso delle perossidasi.

Un altro passaggio fondamentale in una colorazione immunoistochimica è rappresentato dal bloccaggio dei siti aspecifici che potrebbero interferire con il risultato; questi sono siti ai quali gli anticorpi si possono legare in modo aspecifico, sia l'anticorpo primario che l'anticorpo secondario mediante interazioni idrofobiche. Per prevenire questo problema è necessario effettuare una incubazione con il siero pre-immune dell'animale in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario.

2.3.2 Processo di preparazione di tessuto cerebrale adulto

Gli animali sono stati anestetizzati con cloralio idrato (350 mg/kg, i.p.) e sacrificati tramite perfusione trascardiaca di soluzione fisiologica a freddo (4°C), seguita da soluzione di fissativo (4% di paraformaldeide in PBS). I cervelli vengono poi dissezionati e conservati nel liquido di perfusione per almeno 72 ore a 4°C; successivamente vengono crioprotetti in una soluzione di saccarosio al 30% in PBS o/n a 4°C e poi congelati; in seguito, i cervelli vengono tagliati con un criostato a livello delle regioni del CPu e della SN con fettine dello spessore di 50 µm.

2.3.3 Metodica immunoistochimica per la tirosina idrossilasi (TH)

I neuroni dopaminergici sono stati identificati tramite una reazione immunoistochimica per la tirosina idrossilasi (TH). Tale enzima è responsabile della trasformazione della tirosina in L-DOPA, prima tappa della sintesi delle catecolamine. E' ben noto che i neuroni TH-positivi presenti nel mesencefalo ventrale sono di natura dopaminergica (Dahlstrom e Fuxe, 1964).

L'immunoreattività per la tirosina idrossilasi (TH), è stata eseguita sulle sezioni secondo una metodica descritta in

precedenza (Sternberger,1970) apportando alcune modifiche. Inizialmente alle sezioni poste nei pozzetti sono stati effettuati due lavaggi in PBS+Triton (0,1M) per 15 minuti ciascuno. Di seguito sono state incubate 15 minuti in H₂O₂ allo 0,3% (in PBS+Triton), per inattivare le perossidasi endogene. Nuovamente sono stati effettuati due lavaggi, dopo di che è stato introdotto l'NGS (normal goat serum) al 10% in PBS+triton, trattamento che permette di diminuire i legami aspecifici dell'anticorpo primario. Dopo un'ora viene aggiunto l'anticorpo primario anti-TH alla concentrazione 1:1000, l'incubazione viene fatta a 4°C per 24 ore. Per stabilire la diluizione di Ab opportunamente, sono state fatte diverse prove con concentrazioni crescenti. Quella che dava il risultato migliore è stata la diluizione 1:1000. Successivamente ad un doppio lavaggio è stato incubato l'anticorpo secondario biotinilato per almeno 2 ore; a questo punto è stato incubato con il complesso Avidina-Biotina (ABC) per 30 minuti seguito da due lavaggi. Infine lo sviluppo della colorazione è avvenuto grazie alla reazione della perossidasi con il cromogeno 3,3-diamminobenzidina (DAB) e all'aggiunta del substrato H₂O₂, questo ha dato luogo alla formazione di una colorazione marrone dei neuroni dopaminergici. Avvenuta la colorazione le sezioni sono state montate su vetrini utilizzando una soluzione di gelatina liquida (1% gelatina in 40% etanolo), in seguito attraverso una serie di passaggi in soluzioni a concentrazione alcoliche crescenti sono stati

disidratati, passati in xilolo e chiusi con un vetrino coprioggetto e un montante solubile in xilolo, infine osservati al microscopio ottico. Le immagini sono state raccolte usando una videocamera CoolSnap e analizzate con l'aiuto di un software dedicato (Metamorph).

2.3.4 Metodica immunoistochimica DAT

Essenzialmente il protocollo usato è paragonabile a quello prima descritto per l'immunoistochimica TH. Cambia l'anticorpo primario che è invece un anticorpo monoclonale sviluppato in ratto (rat anti DAT) ed un anticorpo secondario anti ratto coniugato alla biotina

2.4. Dosaggio della dopamina e dei suoi metaboliti

I campioni di tessuto sono stati omogenati, mediante sonicatore, in 600µl di acido perclorico 0.1N contenente 10pg/µl di diidrossibenzilamina (DBA) come standard interno; un'aliquota di omogenato è stata utilizzata per il saggio delle proteine. Tale saggio è necessario per normalizzare i livelli di DA e dei suoi metaboliti con la quantità di tessuto estratto ed è stato fatto mediante analisi spettrofotometrica utilizzando il metodo di Lowry (Lowry et al., 1951) usando l'albumina sierica bovina come

standard. Gli omogenati sono stati centrifugati e nel surnatante sono stati determinati i livelli delle monoamine e dei loro metaboliti con HPLC a fase inversa accoppiato ad un rilevatore elettrochimico. Un litro di fase mobile contiene 10.35gr (75mM) di sodio di-idrogeno ortofosfato, 0.505gr di acido eptansulfonico (2.5mM), 0.93gr di EDTA 25uM, 100µl di trietilamina, 200ml di acetonitrile. La fase mobile viene portata ad un pH finale di 3 con acido fosforico. La fase inversa, è una C18 Inertisil ODS-3, 4.6x250x250mm, 5µm (Beckman, San Ramon, CA, USA). La fase mobile (filtrata e degassata) è stata mandata ad un flusso di 1.2ml/min; al detector 1 è stato applicato un potenziale pari a -0.10V mentre al detector 2 un potenziale di +0.30V.

Analisi statistica: Per il dosaggio delle catecolamine, è stata preparata una curva standard utilizzando quantità note di DA e metaboliti disciolti in acido perclorico 0.1N contenente una quantità costante (10pg/µl) di standard interno (DBA), presenti anche nei campioni di tessuto. Le curve standard per ogni composto analizzato sono state calcolate usando l'analisi di regressione dei rapporti delle area dei picchi (area del composto/area della DBA) per diverse concentrazioni di ogni composto registrato all'elettrodo di riduzione. Un'analoga analisi di regressione è stata fatta per l'elettrodo di ossidazione. Per i livelli di DA e dei suoi metaboliti i risultati sono espressi come la media

± S.E.M. del numero di animali per gruppo. Differenze sui livelli striatali di catecolamine sono stati valutati statisticamente usando l'analisi della varianza con il test di Sheffe-F. Le ipotesi nulle sono state rifiutate quando $p < 0.05$.

3. SCOPO DELLA TESI

La malattia di Parkinson è conosciuta come un disordine debilitante caratterizzato dalla lenta degenerazione dei neuroni dopaminergici che coinvolge la SNpc. Ne consegue una sostanziale diminuzione del rilascio di dopamina nei nuclei Caudato e Putamen e quindi un'inibizione dei centri motori. La MP infatti si manifesta in base alla compromissione del sistema motorio (tremore, acinesia e rigidità muscolare) ed è caratterizzata dalla formazione di inclusioni intracitoplasmatiche dovute ad alterazioni nel ripiegamento di alcune proteine (Corpi di Lewy).

Nel sistema nervoso centrale del mammifero le fonti principali di dopamina sono i neuroni dopaminergici mesencefalici. Sono localizzati in tre nuclei: SNpc, VTA, RRF. Dopo la differenziazione, tutti i neuroni dopaminergici mesencefalici esprimono i fattori di trascrizione a omeodominio En1 e En2. I neuroni dopaminergici di topi doppi mutanti Engrailed (En1^{-/-}, En2^{-/-}) vengono normalmente indotti nel neuroepitelio, diventano post mitotici e iniziano ad esprimere il loro fenotipo neurotrasmettitoriale dopaminergico ma vanno incontro, dopo pochi giorni, a morte apoptotica ad opera della Caspasi-3. In base a questi studi l'ipotesi formulata è che i geni Engrailed abbiano una funzione gene-dose dipendente sul mantenimento e sulla protezione dei

neuroni mesencefalici anche nell'adulto. Infatti, poiché i geni *Engrailed* sono fattori di trascrizione, l'alterazione della loro espressione influenza la trascrizione dei geni target innescando una cascata di eventi che potrebbero causare fenomeni di neurodegenerazione a carico del sistema dopaminergico mesencefalico.

In questo studio è stata preso in esame per la prima volta un genotipo murino *Engrailed* doppio eterozigote ($En1^{+/-}/En2^{+/-}$), effettuando un'analisi approfondita del sistema dopaminergico nigrostriatale. L'analisi è stata effettuata allo scopo di confermare l'effetto *Engrailed* gene-dose dipendente sulla sopravvivenza dei neuroni dopaminergici mesencefalici, ed evidenziare un'eventuale deficienza del sistema dopaminergico.

4. RISULTATI

4.1 Introduzione ai risultati

L'analisi effettuata da Simon et al. indica che delezioni progressive dei 4 alleli dei due geni Engrailed producono un effetto progressivamente più marcato sulla sopravvivenza della popolazione dopaminergica (Simon et al., 2001). Sono stati analizzati diverse combinazioni genotipiche dei due geni:

Topi En1^{-/-}En2^{-/-} Muoiono alla nascita e mostrano gravi delezioni del territorio mesencefalico e una perdita completa di neuroni dopaminergici a E14 (Simon et al., 2001; Alberi et al., 2004).

Topi En1^{-/-}En2^{+/-}; En1^{-/-}En2^{+/+} Muoiono anch'essi alla nascita a causa di gravi difetti al livello del cervelletto (mutazione En1^{-/-}) e presentano lievi alterazioni del sistema dopaminergico (Simon et al., 2001).

Topi En1^{+/-}En2^{-/-}(EnHT) Sopravvivono in età adulta, sono fertili, e dopo 3 mesi di vita presentano una perdita di circa il 70% delle cellule dopaminergiche del sistema nigrostriatale. Dall'esame di esemplari En^{HT} e En2^{-/-} risulta che alla nascita il numero di neuroni dopaminergici è invariato, mentre a 3 mesi di età si ha una progressiva

diminuzione fino al 70% di cellule dopaminergiche a livello della SNpc. La neurodegenerazione a carico del sistema nigrostriatale provoca una diminuzione del rilascio di dopamina nell'area di proiezione nigrostriatale, cioè i nuclei caudato e putamen, che si manifesta con gravi deficit motori (Sgadò et al., 2006).

Topi En2^{-/-} mostrano lievi malformazioni a livello del cervelletto ma hanno un fenotipo dopaminergico normale.

Topi En1^{+/-} hanno un fenotipo dopaminergico che dipende dal background genetico della mutazione. Un recente articolo ha infatti indicato una diminuzione di neuroni dopaminergici mesencefalici di circa il 38% a 12 mesi di vita (Sonnier et al., 2007) mentre dati precedenti

	En1	En2	mesDA
adult	+/+	+/+	normal
	+/-	+/+	
	+/+	+/-	
	+/-	+/-	
	+/+	-/-	
neonatal	+/-	-/-	partial loss
	-/-	+/+	
	-/-	+/-	
	-/-	-/-	none

Figura 4.1

Effetto gene dose:
 effetto mutazioni geni Engrailed sul mantenimento dei neuroni mesencefalici in maniera gene-dose dipendente. Topi con mutazioni nulle del gene En1 muoiono alla nascita e presentano mutazioni del sistema mesencefalico dopaminergico. Topi con altri genotipi Engrailed sono vitali e fertili, tra questi En1^{+/-}-En2^{-/-} presentano una perdita postatale di neuroni dopaminergici al livello della Substantia Nigra. In generale è evidente che le mutazioni En1 risultano molto più gravi delle En2

ottenuti su un background genetico differente non avevano presentato alcuna alterazione (Simon et al., 2001).

Da queste analisi è emerso che i geni *Engrailed* esercitano un controllo gene-dose dipendente sulla sopravvivenza dei neuroni dopaminergici mesencefalici (Figura 4.1). Ciò significa che all'aumentare del numero di alleli deleti si ha un peggioramento del fenotipo accompagnato da un'anticipazione del momento di insorgenza. Questo fenomeno è stato già ampiamente descritto da Simon et al., (2001) e Sgadò et al., (2006).

Le analisi precedenti hanno messo in evidenza come la delezione di un allele *En1* sia una condizione necessaria, ma non sufficiente per indurre la perdita dei neuroni DA nella nigra, e che anche il gene *En2* giochi un ruolo fondamentale, anche se in maniera meno determinante, nel mantenimento di queste cellule (Sgadò et al, 2006).

4.2 Il topo *Engrailed* doppio eterozigote

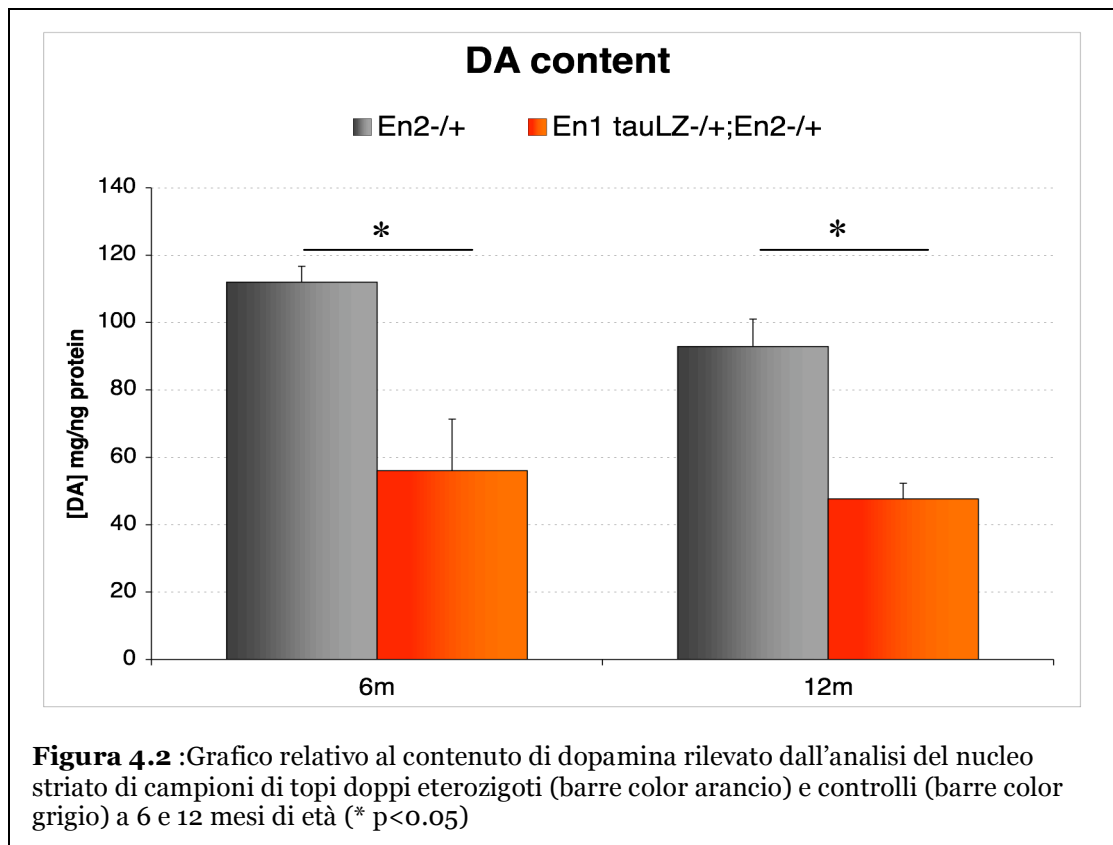
Scopo di questo studio è stato quello di confermare l'effetto gene-dose in un topo adulto di genotipo "intermedio" tra quelli precedentemente analizzati. L'ipotesi formulata è quella che la mutazione in eterozigosi dei geni *Engrailed* porti ad un deterioramento del sistema dopaminergico simile a quello osservato nel genotipo *EnHT* ma che si

manifesti ad uno stadio successivo. Per questa ragione lo studio si è focalizzato sull'analisi dettagliata del sistema dopaminergico in questo particolare genotipo mutante *Engrailed*.

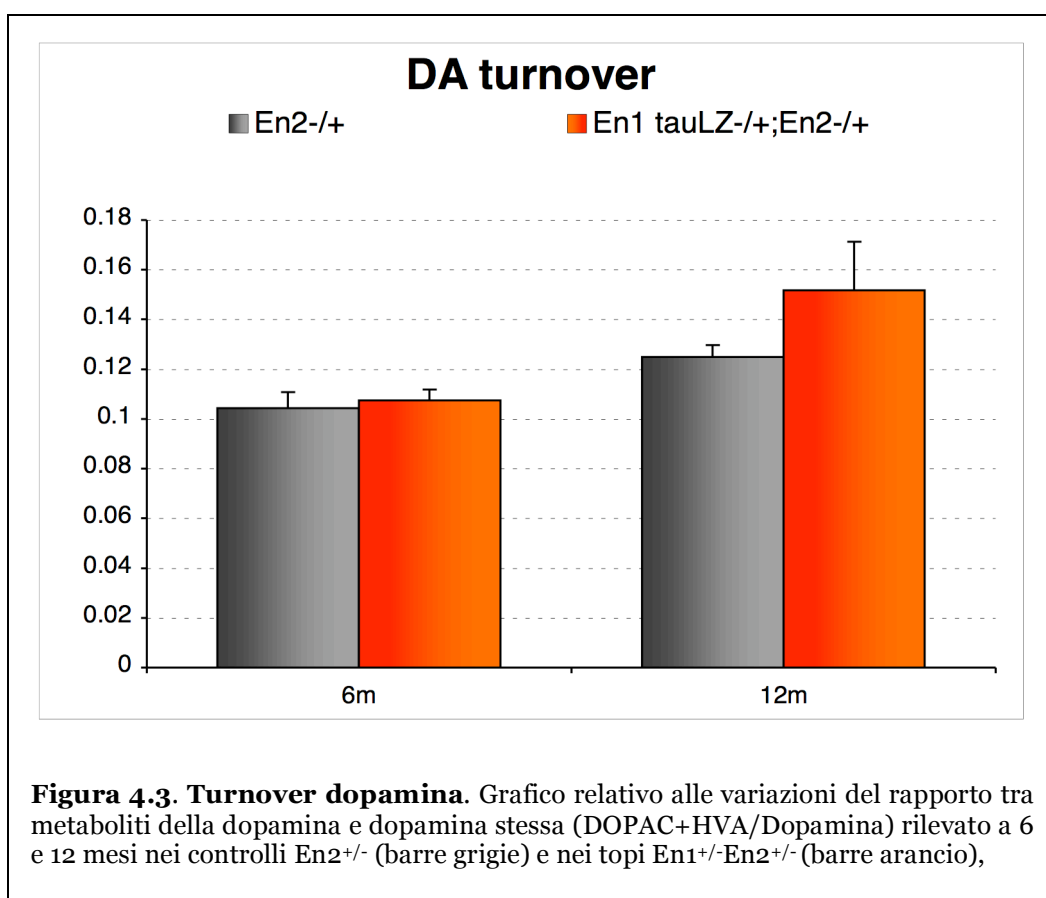
Tutte le analisi sono state eseguite contemporaneamente sul doppio eterozigote e su un controllo, in modo di poter sempre comparare i dati ottenuti. Il genotipo $En2^{+/-}$ è stato usato come controllo, per minimizzare la variabilità infatti l'analisi risulta più precisa se eseguita su esemplari provenienti dalla stessa colonia e, quando possibile, dalla stessa nidiata. Essendo la colonia ottenuta da topi doppi eterozigoti incrociati, da cui si ottengono tutte le combinazioni di genotipi, la probabilità di ottenere un Wild-Type è molto bassa, (1 su 8). La scelta del controllo è stata quindi dettata dall'esigenza di avere un numero sufficiente di esemplari. Inoltre era stato dimostrato in precedenza che la mutazione limitata al gene *En2* produce un fenotipo dopaminergico normale essendo gli unici difetti a livello del cervelletto (Sgadò et al., 2006). Quindi il genotipo $En2^{+/-}$ può essere considerato comparabile al Wild-Type almeno dal punto di vista del fenotipo dopaminergico. A conferma di ciò, gli esperimenti sono stati ripetuti, quando possibile, anche su pochi esemplari Wild-Type provenienti dalla stessa colonia.

4.3 Analisi del contenuto dopamina

In primo luogo è stata fatta una stima del contenuto di dopamina a diverse età post natali mediante HPLC. L'esame viene fatto sulla parte dorsale del nucleo striato, ricavato ex-vivo. La dopamina così misurata è quella presente al livello dei terminali sinaptici che comprende sia quella sintetizzata ex-novo che quella derivante dalla ricaptazione ad opera del trasportatore dopaminergico DAT. I risultati di tale analisi hanno evidenziato un cospicua differenza tra $En2^{+/-}$ e $En1^{+/-}En2^{+/-}$, è stata infatti rilevata una diminuzione di dopamina di circa il 50% nel nucleo striato di topi $En1^{+/-}En2^{+/-}$ rispetto ai controlli $En2^{+/-}$ (Figura 4.2).



Questi dati hanno permesso anche di valutare il turnover della dopamina (DOPAC+HVA/DOPAMINA) e quindi di ricavare informazioni sul rapporto tra metaboliti della dopamina e dopamina stessa (Figura 4.3). L'aumento del turnover è in genere considerato come un segnale di stress cellulare, si rileva infatti sia nel mutante che nel controllo con l'avanzare dell'età, sintomo dato probabilmente dall'invecchiamento cellulare. Nei topi doppi eterozigoti, però, l'aumento rilevato è di maggior intensità, dimostrazione che comunque esistono degli scompensi a livello del sistema dopaminergico. Tuttavia l'analisi ha



dimostrato che la differenza tra il DA turnover dei due genotipi non è statisticamente significativo né a 6 né a 12 mesi. Da questi dati emerge che nei topi doppi eterozigoti, la mutazione *Engrailed* comporta probabilmente degli scompensi al livello di neurotrasmissione dopaminergica.

4.4 Analisi immunoistochimica

Per rilevare la distribuzione e il numero di cellule dopaminergiche è stata eseguita un'analisi immunoistochimica correlata con il conteggio delle cellule dopaminergiche. L'esame istologico del tessuto è avvenuto tramite immunoistochimica con anticorpi anti tirosina idrossilasi (TH), l'enzima limitante la sintesi della dopamina che è espresso in tutte le cellule dopaminergiche.

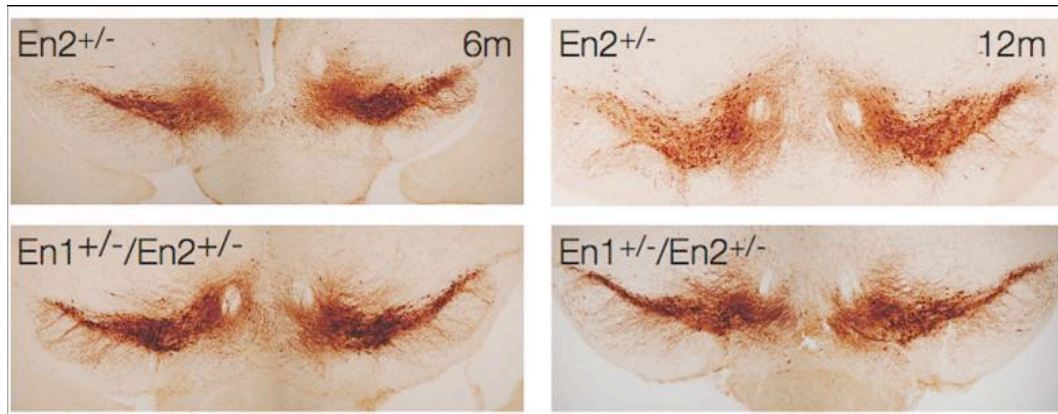
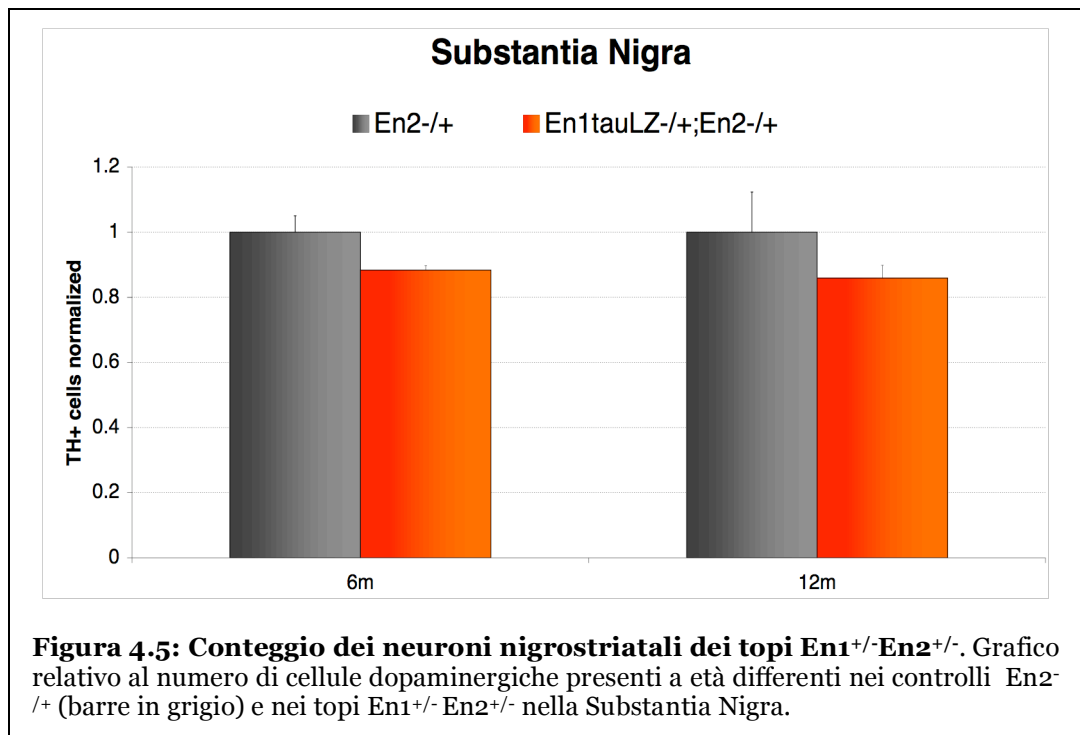


Figura 4.4 Neuroni dopaminergici rilevati con immunoistochimica TH nella Substantia Nigra degli *En1*^{+/-}*En2*^{+/-}. Immunoistochimica TH di sezioni seriali coronali della parte anteriore del mesencefalo (SN). L'analisi delle sezioni dimostra che non vi è una differenza sostanziale né nel numero né nella distribuzione dei neuroni dopaminergici dei doppi eterozigoti *En1*^{+/-}*En2*^{+/-} rispetto ai controlli *En2*^{+/-}.

L'analisi delle cellule TH positive non ha evidenziato differenze nella morfologia e nella distribuzione delle cellule dopaminergiche nei due genotipi (Figura 4.4).

Per avere una stima più precisa è stata effettuata un'analisi più dettagliata del numero di cellule dopaminergiche. I risultati sono riportati nel grafico presentato in Figura 4.5. È stata osservata una lieve diminuzione del numero di cellule dopaminergiche nei doppi eterozigoti rispetto ai controlli, tuttavia non è stato possibile evidenziare una significatività del dato in quanto la differenza è inferiore al 10%. Inoltre, una diminuzione così esigua nel numero delle cellule non può essere comparabile a quella della dopamina rilevata nei terminali, che risulta invece molto più marcata (50%).



Questi risultati suggeriscono che le alterazioni a livello di neurotrasmissione dopaminergica osservate non sono imputabili ad una perdita di cellule dopaminergiche ma probabilmente derivano da problematiche nel rilascio del neurotrasmettitore dovute a modificazioni delle proiezioni dopaminergiche nel nucleo striato.

4.5 Analisi immunoistochimica DAT

Sulla base di questi risultati e dell'ipotesi che le problematiche nella neurotrasmissione fossero determinate da scompensi al livello dei terminali, è stata condotta un'ulteriore analisi immunoistochimica nel nucleo striato dove è concentrata la maggior parte delle proiezioni della via nigrostriatale. A questo scopo l'analisi è stata effettuata su sezioni ricavate dal nucleo striato dorsale di topi dei due genotipi. Mediante l'utilizzazione di un anticorpo (rat anti-DAT) monoclonale specifico per il trasportatore della dopamina (DAT) sono stati così esaminate eventuali differenze a livello dei siti di rilascio di dopamina dei doppi eterozigoti rispetto ai controlli (Figura 4.6). Da una prima analisi risulta evidente che esiste una sostanziale differenza nella marcatura dell'immunopositività al DAT. Più precisamente è stata rilevata una diminuzione quasi completa dei livelli di DAT nella parte dorsale del nucleo striato dei doppi eterozigoti mentre nei controlli la

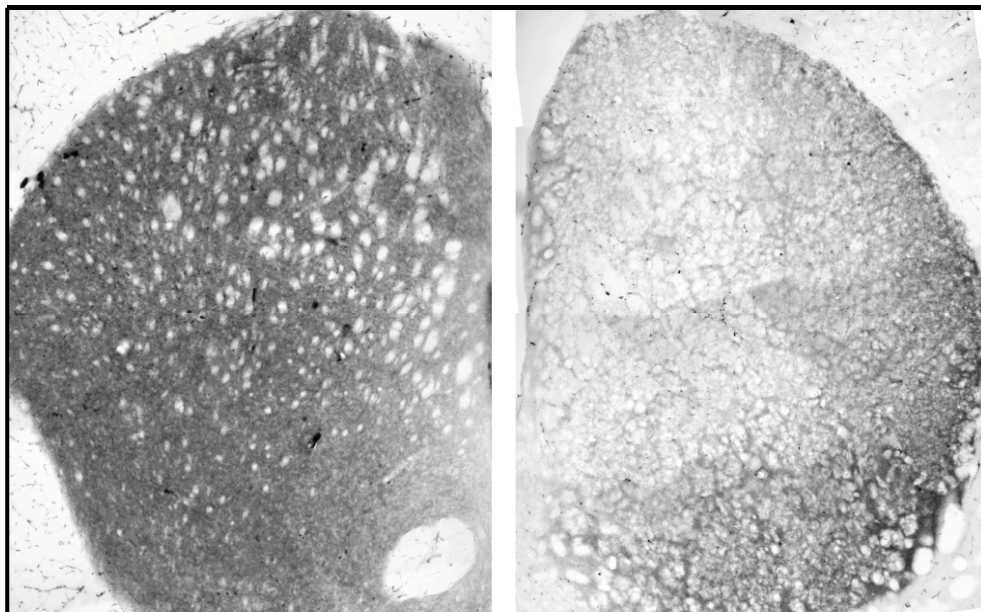


Figura 4.6 Terminali dopaminergici. Immunoistochimica DAT di sezioni di nucleo Striato dorsale . L'analisi delle sezioni dimostra una spiccata diminuzione della concentrazione del trasportatore della dopamina (DAT) nelle proiezioni dopaminergiche dei doppi eterozigoti $En1^{+/-}En2^{+/-}$ (destra) rispetto ai controlli $En2^{+/-}$ (sinistra).

marcatura risulta essere a livelli normali. La differenza è leggermente meno spiccata nella parte ventrale dello striato, ma è comunque evidente. Questi risultati confermano la nostra ipotesi secondo la quale la diminuzione del contenuto di dopamina nello striato sarebbe causata da alterazioni a livello della neurotrasmissione dopaminergica e non dalla degenerazione delle cellule a livello della Substantia Nigra. Queste alterazioni potrebbero coinvolgere l'espressione della proteina DAT a livello trascrizionale oppure essere determinate da alterazioni che coinvolgono la funzionalità dei terminali dopaminergici. Ulteriori studi saranno necessari per vagliare le due ipotesi.

5. DISCUSSIONE

I fattori di trascrizione a omeodominio Engrailed-1 e Engrailed-2 (En1 e En2) sono espressi in tutti i neuroni dopaminergici del mesencefalo dall'inizio della differenziazione postmitotica fino all'età adulta. Nei topi i cui geni Engrailed sono mutati, è stato osservato un effetto gene-dose dipendente in relazione alla sopravvivenza dei neuroni dopaminergici mesencefalici; ciò indica che questi geni svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento della popolazione dopaminergica embrionale e adulta (Simon et al., 2001; Alberi et al., 2004, Sgadò et al., 2006). L'analisi effettuata da Simon et al. indica che delezioni progressive dei 4 alleli dei due geni Engrailed producono un effetto progressivamente più marcato sulla popolazione dopaminergica. Infatti, negli embrioni doppi mutanti (En1^{-/-}/En2^{-/-}) si osserva la completa assenza di cellule dopaminergiche a partire da E14 (giorno embrionale 14), invece nel genotipo En1^{-/-}/En2^{+/+}, così come in quello En1^{-/-}/En2^{+/-}, si riscontra una leggera perdita della popolazione dopaminergica alla nascita. Nel caso del genotipo En1^{+/-}/En2^{-/-}, è stata osservata una perdita progressiva di neuroni dopaminergici che colpisce selettivamente la Substantia Nigra in età adulta (Sgadò et al., 2006). È ipotizzabile

quindi che l'effetto Engrailed gene-dose dipendente sulla sopravvivenza dei neuroni dopaminergici sia visibile anche in altri genotipi Engrailed. In questo studio abbiamo analizzato un genotipo mutante Engrailed doppio eterozigote che non era stato analizzato in precedenza, allo scopo di evidenziare deficienze del sistema dopaminergico.

L'analisi presentata in questo studio ha messo in evidenza come l'inattivazione parziale dei geni Engrailed nei topi $En1^{+/-}En2^{+/-}$ produce alterazioni a carico del sistema dopaminergico. In particolare è stata osservata una diminuzione del contenuto di dopamina ed alterazioni delle terminazioni dopaminergiche a livello striatale, mentre non vi sono alterazioni nella distribuzione e nel numero delle cellule dopaminergiche a livello del mesencefalo.

Studi precedenti hanno messo in evidenza come l'inattivazione dei geni Engrailed influisca sulla sopravvivenza dei neuroni dopaminergici mesencefalici. Nei genotipi precedentemente analizzati si osserva infatti l'attivazione di fenomeni apoptotici in seguito alla delezione dei geni Engrailed (Alberi et al., 2004; Sgadò et al., 2006). Nel caso del genotipo analizzato in questo studio, la mutazione in eterozigosi dei due geni Engrailed non altera apparentemente la sopravvivenza delle cellule dopaminergiche, mentre la diminuzione del contenuto di dopamina nello striato indica che la neurotrasmissione dopaminergica è compromessa. Lo studio dettagliato del

fenotipo ha messo in evidenza una carenza dell'espressione del DAT che è implicato nella ricaptazione della dopamina all'interno della cellula presinaptico allo scopo di metabolizzarla. La mancata espressione della proteina DAT porterebbe ad una diminuzione della ricaptazione, e quindi della dopamina presente nei terminali sinaptici, contemporaneamente provocherebbe una diminuzione della dopamina disponibile per la degradazione, e quindi una diminuzione dei metaboliti. In accordo con questa ipotesi i nostri risultati mostrano una diminuzione del contenuto di dopamina e dei suoi metaboliti, infatti il turnover della dopamina (HVA+DOPAC/DA) non risulta alterato. L'analisi dell'espressione della proteina DAT rappresenta un'ulteriore conferma della compromissione del sistema di smaltimento della dopamina che potrebbe essere esteso anche ad altri componenti. A questo proposito sarebbe opportuno effettuare un'analisi più approfondita delle proteine implicate nella ricaptazione, nello storage e nello smaltimento della dopamina.

La mancata espressione della proteina DAT osservata nello striato di topi doppi eterozigoti *Engrailed* potrebbe indicare una regolazione specifica del trasportatore da parte di questi fattori di trascrizione. In questo caso l'alterazione dell'espressione del DAT rappresenterebbe la causa degli scompensi del sistema dopaminergico. Questa ipotesi deve essere verificata anche se una tale regolazione non è stata

precedentemente descritta per gli altri genotipi Engrailed. In alternativa, l'alterazione dell'espressione del DAT potrebbe indicare uno scompenso del sistema di smaltimento o nel metabolismo della dopamina. In questo caso l'espressione del DAT rappresenterebbe una caratteristica del fenotipo e non la principale causa.

In conclusione, quest'analisi ha messo in evidenza un nuovo modello di deplezione dopaminergica su cui sarà possibile studiare l'instaurarsi di meccanismi di compenso a livello dei circuiti cerebrali sui quali la dopamina ha un effetto neuromodulatorio.

6. BIBLIOGRAFIA

Alberi, L., Sgado, P., and Simon, H. (2004). Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development*, 131(13):3229–3236.

Albin, R., Young, A., and Penney, J. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12(10):366–375.

Bertler, A., Carlsson, A., and Rosengreen, E. (1959). Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia*, 15:10.

Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., e Martignoni, E. (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 62(1):63–88.

Bjorklund, A. and Falck, B. (1969). Pituitary monoamines of the cat with special reference to the presence of an unidentified monoamine-like substance in the adenohypophysis. *Zellforsch Mikrosk Anat*, 93(2):254–264.

Bjorklund, A. and Hokfelt, T. (1984). Classical transmitters in the cns. In Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol.2, pages 1–463. Elsevier, Amsterdam.

Bjorklund, A., Lindvall, O., and Nobin, A. (1975). Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neurone system in the rat. Brain Res, 89(1):29–42.

Callahan, C. A. and Thomas, J. B. (1994). Tau-beta-galactosidase, an axon-targeted fusion protein. Proc Natl Acad Sci U S A, 91(13):5972–5976.

Cajal, S. (1911). Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres. Maloine, Paris.

Carlsson, A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamine in the nervous system. Pharmacol Rev, 11:490–493.

Corsini G.U., Maggio R. e Vaglini F. (2002) Molecular e cellular events regulating dopamine neuron survival. Hanbook of Exp.Pharm. 154 (II),321-386

Dahlstrom, A. e Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem.Experientia, 20(7):398–399..

Dahlstrom A. e Fuxe K. (1964) Evidence of the existence of monoamine containig neurons in the central nervuos system. I. Demonstration of monoamine in cell bodies of brain stem neuron. *Acta physiol. Scand.*, 62, Suppl. 232: 1-55

Fahn, S. (2003). Description of parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 991:1–14.

Fallon, J. e Moore, R. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. iv.topography of the dopamine projection to the basal forebrain e neostriatum. *J Comp Neurol*, 180(3):545–580..

Foote, S., Bloom, F., and Aston-Jones, G. (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, 63(3):844–914.

Fuxe, K. (1965). Evidence for the existance of monoamine neurons in the central nervous system. iv distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol Sce Suppl*, 64(Suppl. 247):37–84.

Gerfen, C. (2004). Basal ganglia. In Paxinos, G., editor, *The Rat Nervous System*, 3rd edition, pages 455–508. Academic Press, San Diego.

Gerfen, C., Baimbridge, K., and Miller, J. (1985). The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(24):8780–8784.

Girault, J. and Greengard, P. (2004). The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol*, 61(5):641–644.

Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*, 294(5544):1024–1030.

Haber, S., Ryoo, H., Cox, C., and Lu, W. (1995). Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mrna for the dopamine transporter: comparison with the mrna for the d2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol*, 362(3):400–410.

Hirsch, E., Mouatt, A., Thomasset, M., Javoy-Agid, F., Agid, Y., and Graybiel, A. (1992). Expression of calbindin d28k-like immunoreactivity in catecholaminergic cell groups of the human midbrain: normal distribution and distribution in parkinson's disease. *Neurodegeneration*, 1:83–87.

Joel, D. and Weiner, I. (2000). The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*, 96(3):451–474.

Joyner, A. L., Herrup, K., Auerbach, B., Davis, C. A., e Rossant, J. (1991). Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the *en-2* homeobox. *Science*, 251(4998): 1239-1243.

Kandel, E., Schwartz, J., and Jessel, T. (2000). *Principles of Neural science*. McGraw-Hill.

Kebabian, J. and Greengard, P. (1971). Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science*, 174(16):1346–1349.

Kuemerle, B., Zanjani, H., Joyner, A., e Herrup, K. (1997). Pattern deformities e cell loss in engrailed-2 mutant mice suggest two separate patterning events during cerebellar development. *J Neurosci*, 17(20):7881–7889.

Kumer, S. C. e Vrana, K. E. (1996). Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity e gene expression. *J Neurochem*, 67(2):443–462.

Mink, J.W. and Thach, W.T. (1993) Basal ganglia intrinsic circuit sand their role in behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**, 950-957

Moore, R. and Bloom, F. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1:129–169.

Parent, A. and Lavoie, B. (1993). The heterogeneity of the mesostriatal dopaminergic system as revealed in normal and parkinsonian monkeys. *Adv Neurol*, 60:25–33.

Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N., e Olanow, C. W. (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 23(10 Suppl):S8–19.

Sano, T. (1910). Beitrag zur vergleichenden anatomie der Substantia Nigra, des corpus luyssii und der zona incerta. *Mschr Psychiat Neurol*, 27:110–127.

Saueressig, H., Burrill, J., and Goulding, M. (1999). Engrailed-1 and netrin-1 regulate axon pathfinding by association interneurons that project to motor neurons. *Development*, 126(19):4201–4212.

Sesack, S. (2003). Synaptology of dopamine neurons. In Di Chiara, G., editor, Handbook of Experimental Pharmacology. Dopamine in the CNS I, pages Vol. 154, 63–119. Springer, Berlin.

Sgadò, P., Alberi, L., Gherbassi, D., Galasso, S. L., Ramakers, G. M. J., Alavian, K.N., Smidt, M. P., Dyck, R. H. and Simon, H. H. (2006) Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal Engrailed mutant mice. . Proc Natl Acad Sci U S A, 103(41):15242-47.

Sidhu, A. (1998). Coupling of d1 and d5 dopamine receptors to multiple g proteins: Implications for understanding the diversity in receptor-g protein coupling. Mol Neurobiol, 16(2):125–134.

Sidhu, A., Wersinger, C., and Vernier, P. (2004). Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? FASEB J, 18(6):637–647.

Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding. M. D., e O’Leary, D. D. (2001). Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. J Neurosci, 21(9):3126-3134.

Sonnier, L., Le Pen, G., Hartmann, A., Bizot, J.C., Trovero, F., Krebs, M.O. and Prochiantz, A. (2007). Progressive Loss

of Dopaminergic Neurons in the Ventral Midbrain of Adult Mice Heterozygote for Engrailed1. *J. Neurosci*, 27(5):1063–1071

Smith, A. and Bolam, J. (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci*, 13(7):259–265.

Sternberger L.A., Hardy P.H. JR., Cuculis J.J. e Meyer H.G. (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry-Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes *J. Histochem. cytochem.* 18:315-333

Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl*, 367:1–48.

Wichmann T., e DeLong M.R. (1993) Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv. Neurol.* 60, 53-61